

**МАТЕРИАЛЫ  
ФОРУМА**

**FORUM  
PROCEEDINGS**



**МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ**

**INTERNATIONAL FORUM**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:  
СОСТОЯНИЕ  
И ПЕРСПЕКТИВЫ  
РАЗВИТИЯ**

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

**23 - 25 МАЯ 2018  
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,  
ИЛЬИНКА, 4**

**23 - 25 MAY, 2018  
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,  
MOSCOW**



[WWW.BIOMOS.RU](http://WWW.BIOMOS.RU)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ФОРУМ

INTERNATIONAL FORUM

**БИОТЕХНОЛОГИЯ:  
СОСТОЯНИЕ  
И ПЕРСПЕКТИВЫ  
РАЗВИТИЯ**

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

23 - 25 МАЯ 2018  
МОСКВА, ГОСТИНЫЙ ДВОР,  
ИЛЬИНКА, 4

23 - 25 MAY, 2018  
ILYNKA 4, GOSTINY DVOR,  
MOSCOW

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

Материалы международного форума  
«Биотехнология: состояние и перспективы  
развития»  
23 - 25 МАЯ 2018 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 упущения в названиях и адресах,  
представленных в данном сборнике.  
Любое копирование и использование  
материалов без письменного разрешения  
Программного комитета не разрешено.

УДК 575.1/2::612.017.1 ББК 28.072  
ISBN 978-5-9909118-0-2-6  
ISSN: 2312-640X

© ООО "РЭД ГРУПП"  
119049, г. Москва, ул. Донская, д. 2, стр. 1  
info@biomos.ru www.biomos.ru

Все права на издание принадлежат ООО "РЭД  
ГРУПП"- 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»  
MAY 23 - 25, 2018.

**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» 2018 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 978-5-9909118-0-2-6  
ISSN: 2312-640X

Copyright © LLC "RED GROUP"  
Moscow, Donskaya str., 2, b.1  
info@biomos.ru www.biomos.ru

All Rights Reserved by LLC "RED GROUP - organizer of  
the International forum «Biotechnology: state of the  
art and perspectives».

# СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENT

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

Научный комитет / Scientific committee ..... 5 / 8

### Материалы форума

#### 1. Фундаментальные вопросы биотехнологии / Biotechnology: foundations and challenges

Фундаментальные исследования в биотехнологии / Fundamental research in biotechnology ..... 9

Биотехнология надорганизменных систем / Biotechnology of supra organismal systems ..... 15

#### 2. Геномная инженерия / Genetic engineering

Приоритет 20В Стратегии научно-технологического развития РФ: технологии здоровьесбережения, геномная и постгеномная медицина / Strategy for Science and Technology Development of Russia, Priority 20V: technologies for health, genomic and postgenomic medicine ..... 44

Умные материалы для диагностики и терапии: возможности синтетической биологии / Potentials of synthetic biology: smart materials for diagnostics and therapeutics ..... 91

Терапия онкозаболеваний человека с помощью вирусов / Using viruses as cancer treatment ..... 115

#### 3. Биотехнология и медицина / Biotechnology and medicine

Биобезопасность: антибиотики, вакцины и микробиота / Biosafety: antibiotics, vaccines and microbiota ..... 124

Биоматериалы в биотехнологиях и медицине / Biomaterials in biotechnology and medicine ..... 192

Метагеномика и персонализированная медицина / Metagenomics and personalized medicine ..... 329

Омиксные технологии в клинической онкологии. Лечение с позиций биоинформатики, молекулярной/ клеточной биологии и клинической медицины / Using omic technologies in clinical oncology. Treatment in terms of bioinformatics, molecular /cellular biology and clinical medicine ..... 354

Современная иммунология / Modern immunology ..... 372

Достижения в области 3D-биопринтинга и биофабрикации /  
Achievements in 3D bioprinting and biofabrication ..... 435

#### **4. Биофарма / Biopharmaceutics**

Инновационные технологии и оборудование в биофармацевтике, российско-швейцарский  
симпозиум / Russian-Swiss symposium: new technologies and equipment in biopharmaceutics ..... 452

Моноклональные антитела: наука, бизнес, государство /  
Monoclonal antibodies: science, business, government ..... 484

Регенеративная и клеточная медицина/Regenerative and cellular medicine ..... 517

#### **5. Биоинформатика и IT / Bioinformatics and IT**

Большие массивы данных в клинической медицине / Big data in clinical medicine ..... 524

#### **5. Биоэкономика / Bioeconomics**

Биосенсорика: современные вызовы и решения / Biosensorics: challenges and solutions ..... 541

Биотехнология и наука о пище. Современные подходы к конструированию продуктов питания /  
Biotechnology and sitology. Modern approach in food product construction ..... 581

Биотехнология и химия биомассы / Biomass and chemistry biotechnology ..... 697

Лесная биотехнология. От науки к практике / Forest biotechnology. From science to practice ..... 761

Образовательные программы в биотехнологии / Education programs in biotechnology ..... 778

Современные биотехнологии в сельскохозяйственном производстве /  
Modern biotechnology in agriculture ..... 797

Сценарии перехода к новому сельскому хозяйству и функциональному питанию:  
в поисках путей реализации приоритета научно-технической политики РФ / Perspectives  
for technology development of specialized food products with adoptogenic properties, based  
on enzymic hydrolyzates which are produced from aquaculture mussels farmed on artificial substrates ..... 849

Разработка и регистрация биотехнологических лекарственных средств /  
Biopharmaceutical drug's research and registration ..... 856

# ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

<b>Быков Валерий Алексеевич</b>	академик РАН, советник Президиума РАН, главный научный сотрудник Всероссийского института лекарственных растений, председатель Организационного комитета
<b>Арчаков Александр Иванович</b>	академик РАН, научный руководитель Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, сопредседатель Оргкомитета
<b>Романовский Михаил Юрьевич</b>	д.ф.-м.н., начальник Управления координации и обеспечения деятельности организаций в сфере науки ФАНО России, сопредседатель Оргкомитета
<b>Чехонин Владимир Павлович</b>	академик РАН, вице-президент РАН, руководитель Отдела и зав. кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, сопредседатель Программного комитета
<b>Алешников Владимир Евгеньевич</b>	руководитель форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития», ответственный секретарь Оргкомитета
<b>Иванов Виктор Петрович</b>	Президент Российского союза химиков
<b>Лисица Андрей Валерьевич</b>	академик РАН, профессор, директор Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича
<b>Кирпичников Михаил Петрович</b>	академик РАН, член Президиума РАН, декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
<b>Лисицын Андрей Борисович</b>	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
<b>Тихонович Игорь Анатольевич</b>	академик РАН, научный руководитель ФГБУН «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», И.о. декана Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров
<b>Чойнзонов Евгений Лхаматцыренович</b>	академик РАН, директор Томского НИМЦ

# ORGANIZING COMMITTEE

<b>Valery A. Bykov</b>	Academician of RAS, National Institute of Medicinal Plants, Chair of the Organizing Committee
<b>Alexander I. Archakov</b>	Academician of RAS, Academic adviser, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Co-Chair of the Organizing Committee
<b>Mikhail Y. Romanovsky</b>	Grand PhD (Physics and Mathematics), Head, Department of Coordination and Support of Operations in Science, Federal Agency for Research Organizations (FANO of Russia), Co-Chair of the Organizing Committee
<b>Vladimir P. Chekhonin</b>	Academician of RAS, vice-president of RAS, Section Leader and Head of the Medical Nanobiotechnologies sub-Department, Pirogov Russian State Medical University, Co-Chair of the Program Committee
<b>Vladimir Y. Aleshnikov</b>	General Director, LLC Expo-Biochem-Technologies, Executive Secretary of the Organizing Committee
<b>Victor P. Ivanov</b>	President, Russian Union of Chemists
<b>Andrey .V. Lisitsa</b>	Academician of RAS, professor, Director of V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
<b>Mikhail P. Kirpichnikov</b>	Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
<b>Andrey B. Lisitsyn</b>	Academician of RAS, Academic adviser of Gorbатов FGBNU VNIIMP, Russian Academy of Agriculture
<b>Igor A. Tikhonovich</b>	Academician of RAS, Academic adviser of National Research Institute of Agricultural Microbiology, Russian Academy of Agriculture, St. Petersburg
<b>Sergey A. Tsyb</b>	PhD (Economics), Deputy Minister of Industry and Trade of the Russian Federation
<b>Eugene L. Choinzonov</b>	Academician of RAS, Director, Tomsk National Research Medical Center

# НАУЧНЫЙ КОМИТЕТ

<b>Варфоломеев Сергей Дмитриевич</b>	член-корр. РАН, научный руководитель Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, председатель Программного комитета
<b>Арчаков Александр Иванович</b>	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, сопредседатель Оргкомитета
<b>Власов Валентин Викторович</b>	академик РАН, научный руководитель Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск
<b>Градова Нина Борисовна</b>	профессор, д.б.н., кафедра биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева
<b>Дзантиев Борис Борисович</b>	профессор, зам. директора Института биохимии им. А.Н.Баха
<b>Евтушенко Евгений Геннадьевич</b>	ассистент кафедры химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова
<b>Зиновьева Наталья Анатольевна</b>	академик РАН, член Президиума РАН, директор ВИЖ им. Л.К. Эрнста
<b>Кирпичников Михаил Петрович</b>	академик РАН, декан биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
<b>Клячко Наталья Львовна</b>	д.х.н., профессор, зам. зав. кафедрой химической энзимологии химического факультете МГУ им. М.В. Ломоносова, заместитель директора Научно-образовательного центра по нанотехнологиям МГУ
<b>Колчанов Николай Александрович</b>	академик РАН, директор Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск
<b>Красильников Игорь Викторович</b>	д.б.н., профессор, заместитель директора по инновациям и международным отношениям ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, г. Санкт-Петербург
<b>Курочкин Илья Николаевич</b>	д.х.н., профессор, директор Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН
<b>Легонькова Ольга Александровна</b>	д.т.н., зав. лабораторией ФГБУ «Институт хирургии им. А.В.Вишневского» Минздрава России
<b>Лисицын Андрей Борисович</b>	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИМП им. В.М. Горбатова
<b>Мартынов Александр Игоревич</b>	к.м.н., первый заместитель директора ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства РФ



<b>Меньшутина Наталья Васильевна</b>	профессор, директор Российско-Швейцарского учебно-научного центра трансфера фармацевтических биотехнологий, РХТУ им. Д.И. Менделеева
<b>Мирошников Анатолий Иванович</b>	академик РАН, член Президиума РАН, зам. директора Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, декан факультета Биотехнологии МГУ им. М.В.Ломоносова
<b>Овчинникова Татьяна Владимировна</b>	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
<b>Панфилов Виктор Иванович</b>	профессор, зав. кафедрой биотехнологии, РХТУ имени Д.И. Менделеева
<b>Поляков Виктор Антонович</b>	академик РАН, директор ГНУ ВНИИПБТ
<b>Поройков Владимир Васильевич</b>	профессор, заведующий отделом биоинформатики Институт биомедицинской химии им.В.Н. Ореховича
<b>Седельникова Галина Васильевна</b>	профессор, заместитель директора Центрального научно-исследовательского геологоразведочного института цветных и благородных металлов
<b>Тихонович Игорь Анатольевич</b>	академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии», И.о. декана Биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Президент Вавиловского общества генетиков и селекционеров
<b>Тутельян Виктор Александрович</b>	академик РАН, член Президиума РАН, научный руководитель ФГУП «ФИЦ питания и биотехнологии»
<b>Хамитов Равиль Авгатович</b>	генеральный директор ООО «МБЦ «Генериум»
<b>Харитонов Владимир Дмитриевич</b>	академик РАН, научный руководитель ГНУ ВНИИ молочной промышленности
<b>Чехонин Владимир Павлович</b>	академик, вице-президент РАН, руководитель Отдела и зав. кафедрой медицинских нанобиотехнологий Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, сопредседатель Программного комитета
<b>Цыганов Дмитрий Игоревич</b>	д.т.н., профессор, зам.начальника управления ФАНО России
<b>Штильман Михаил Исаакович</b>	д.х.н., профессор РХТУ им. Д.И. Менделеева
<b>Яненко Александр Степанович</b>	директор НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика

# SCIENTIFIC COMMITTEE

<b>Sergey D. Varfolomeyev</b>	Corresponding Member of RAS, Research Head of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Co-Chair of the Program Committee
<b>Alexander I. Archakov</b>	Academician, Member of the Presidium of the RAS, Academic Leader of Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, the Russian Academy of Medical Sciences, Co-Chair of the Organizing Committee
<b>Vladimir P. Chekhonin</b>	Academician, Member of the Presidium of RAS, Section Leader and Head of the Medical Nanobiotechnologies sub-Department, Pirogov Russian State Medical University, Co-Chair of the Program Committee
<b>Nina B. Gradova</b>	Professor, Grand PhD (Biology), sub-Department of Biotechnology, Mendeleev Russian University of Chemical Technology
<b>Boris B. Dzantiev</b>	Professor, deputy director of A.N. Bach Institute of Biochemistry
<b>Yevgeny G. Evtushenko</b>	teaching assistant Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University
<b>Natalia A. Zinovyeva</b>	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director of Ernst FGBNU VIZh, Dubrovitsy
<b>Rahim M. Khaitov</b>	Academician of RAS, Academic Leader, FGBU GNC Institute of Immunology, Federal Agency for Medicine and Biology
<b>Vladimir D. Kharitonov</b>	Academician of RAS, FGBNU National Institute of Dairy Industry
<b>R.A. Khamitov</b>	professor General Director of Generium
<b>Mikhail P. Kirpichnikov</b>	Academician of RAS, Dean of Department of Biology, Lomonosov Moscow State University
<b>Nikolay A. Kolchanov</b>	Academician of RAS, Academic adviser of FGBUN Institute of Cytology and Genetics, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
<b>Igor V. Krasilnikov</b>	Grand PhD (Biology), Professor, Deputy Director for Innovations and International Relations, FGUP SPbNIIVS, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg
<b>Natalia L. Klyachko</b>	Grand PhD (Chemistry), Professor, Head of Sub-Department of Chemical Enzimology of Chemistry Department, Moscow State University, deputy director of MSU Nanotechnology Education and Research Center
<b>Ilya N. Kurochkin</b>	Grand PhD (Chemistry), Professor, Director of Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS
<b>Olga A. Legonkova</b>	Grand PhD (Technology), Head of Laboratory, A.V. Vishnevsky Institute of Surgery FSHE, RF Ministry of Health

<b>Andrey B. Lisitsyn</b>	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Academic adviser of Gorbатов FGBNU VNIIMP
<b>Alexander I. Martynov</b>	PhD (Medicine), First Deputy Director of FGBU Institute of Immunology State Research Center, Federal Agency for Medicine and Biology
<b>Natalia V. Menshutina</b>	Professor, Director of International Training and Research Center for Transfer of Pharmaceutical Biotechnologies, Mendeleev Russian University of Chemical Technologies
<b>Anatoly I. Miroshnikov</b>	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Deputy Director of Academicians Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bio-Organic Chemistry of RAS, Chair of the Academic Council of Pushino Research Center of RAS
<b>Tatiana V. Ovchinnikova</b>	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
<b>Victor I. Panfilov</b>	Professor, Head of sub-Department of Biotechnology of Mendeleev Russian University of Chemical Technology
<b>Victor A. Polyakov</b>	Academician of RAS, Director of FGBNU VNIIPBT
<b>Vladimir V. Poroykov</b>	Professor, Head of Bioinformatics Section, Head of Laboratory of Structural and Functional Design of Pharmaceuticals, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry
<b>Galina V. Sedelnikova</b>	Professor, Deputy Director, Central Research Institute of Geological Exploration of Non-Ferrous and Noble Metals
<b>Michail I. Shtilman</b>	Grand PhD (Chemistry), professor, D.I. Mendeleev National University of Chemical Technology
<b>Igor A. Tikhonovich</b>	Academician of RAS, Academic adviser of FGBNU National Research Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg
<b>Dmitry I. Tsyganov</b>	Grand PhD (Technology), Professor, Deputy Head of Department, Federal Agency for Research Organizations
<b>Victor A. Tutelian</b>	Academician of RAS, Member of the Presidium of RAS, Director, FGBNU Research Institute of Nutrition
<b>Valentin V. Vlasov</b>	Academician of RAS, Academic adviser of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Section of RAS, Novosibirsk
<b>Alexander S. Yanenko</b>	director of the National Research Center "Kurchatov Institute"-GosNIIgenetica

# ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

## BIOTECHNOLOGY: FOUNDATIONS AND CHALLENGES

ПЛЕНАРНОЕ ЗАСЕДАНИЕ

### ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

PLENARY SESSION

#### FUNDAMENTAL RESEARCH IN BIOTECHNOLOGY

1. ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ ПРИ МОДУЛЯЦИИ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ, Швядас В. К., Суплатов Д. А., Панин Н. В., Гуранда Д. Ф. .... 9  
ENZYME ENGINEERING: NEW OPPORTUNITIES FOR USING ENZYMES AT MODULATION OF THEIR FUNCTIONAL PROPERTIES, Švedas V. K., Suplatov D. A., Panin N. V., Guranda D. T. .... 10
2. СКРИНИНГ БИОРАЗНООБРАЗИЯ, А.Г. Габиров ..... 11  
SCREENING OF BIODIVERSITY, A.G. Gabibov ..... 12
3. ЦИФРОВАЯ ПРЕЦИЗИОННАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛОМИКИ, Лохов П.Г., Лисица А.В., Арчаков А.И. .... 13  
DIGITAL PRECISION DIAGNOSTICS OF DISEASES BASED ON METABOLOMICS, Lokhov P.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. .... 14

УДК 577.15

### ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ ПРИ МОДУЛЯЦИИ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ

**Швядас В. К., Суплатов Д. А., Панин Н. В., Гуранда Д. Ф.**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва 119991, Ленинские горы д. 1, строение 73, e-mail: vyta@belozersky.msu.ru*

Обсуждаются возможности использования методов биоинформатики, молекулярного моделирования и белковой инженерии для поиска путей модуляции функциональных свойств ферментов, а также создания единой технологической платформы решения этой задачи.

**Ключевые слова:** инженерная энзимология, модуляция свойств ферментов, рациональный дизайн

Последние годы наблюдается вновь возрастающий интерес к ферментам. Демонстрация дополнительных каталитических активностей наряду с давно известной функцией для целого ряда ферментов (явление мунлайтинга), открытие функциональной роли ферментов, потерявших основную функцию (изучение роли так называемых псевдоферментов), появление все большего объема данных, свидетельствующих о том, что аллостерическая регуляция может быть присуща не отдельным, а практически всем ферментам – все эти факты указывают на новые возможности их практического использования. Применение междисциплинарных подходов в рамках единой платформы, позволяющей объединить возможности биоинформатики, молекулярного моделирования, теоретической химии, белковой и генетической инженерии может в значительной степени ускорить этот процесс [1-4]. В докладе будет обобщен опыт лаборатории по созданию и использованию такой платформы в двух областях: для создания биокатализаторов с улучшенными свойствами, а также для дизайна новых лекарственных средств.

Задачу модуляции функциональных свойств ферментов можно решить двумя путями – путем изме-

нения структуры белка, а также в результате взаимодействия фермента с модулирующими молекулами. До недавнего времени в дизайне лекарств основной мишенью являлись активные центры ферментов с целью поиска конкурентных ингибиторов, предотвращающих связывание субстратов и кофакторов. В последние годы становится ясным, что в структуре ферментов наряду с хорошо аннотированными активными центрами имеется существенное количество полостей и участков связывания, функциональная роль которых неизвестна. Чтобы понять, можно ли использовать такие центры для решения практических задач, необходимо их идентифицировать, характеризовать и установить возможную роль в модуляции функции. Для решения этих задач мы предлагаем использовать методологию, объединяющую возможности биоинформатики и молекулярного моделирования, которая реализована в настоящее время в виде 4-х общедоступных серверов.

Разработанная методология была опробована при поиске путей модуляции активности, селективности и стабильности ферментов разных семейств, а также идентификации ранее неизвестных участков связывания в структуре ферментов для связывания модулирующих лигандов. Применение метода позволило увеличить стабильность и синтетическую активность пенициллинацилазы, расширить субстратную специфичность D-аминопептидазы и придать амидазную активность липазе, а также найти специфические ингибиторы ряда ферментов патогенов [5,6].

Исследования поддержаны Российским научным фондом (грант 15-14-00069-П)

#### Литература:

1. Suplatov D., Kopylov K., Popova N., Voevodin V., Švedas V. Mustguseal: Server for Multiple Structure-Guided Sequence Alignments of Protein Families // *Bioinformatics*. – 2018. – DOI:10.1093/bioinformatics/btx831.
2. Suplatov D., Sharapova Y., Timonina D., Kopylov K., Švedas V. The visualCMAT: a web-server to select and interpret correlated mutations/co-evolving residues in protein families // *J. Bioinform. Comput. Biol.* – 2018. – DOI: 10.1142/S021972001840005X
3. Suplatov D. et al. Zebra: a web server for bioinformatic analysis of diverse protein families // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2014. – Vol. 32. – №. 11. – P. 1752-1758.
4. Suplatov D., Kirilin E., Arbatsky M., Takhveev V., Švedas V. pocketZebra: a web-server for automated selection and classification of subfamily-specific binding sites by bioinformatic analysis of diverse protein families // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – №. W1. – P. W344-W349.
5. Shcherbakova T. et al. The  $\beta$ D484N mutant of penicillin acylase from *Escherichia coli* is more resistant to inactivation by substrates and can effectively perform peptide synthesis in aqueous medium // *J. Mol. Catal. B Enzym.* – 2015. – Vol. 112. – P. 66-68.
6. Suplatov D. et al. Computational design of a pH stable enzyme: understanding molecular mechanism of penicillin acylase's adaptation to alkaline conditions // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol.9. – # 6. – e100643.

UDC 577.15

## ENZYME ENGINEERING: NEW OPPORTUNITIES FOR USING ENZYMES AT MODULATION OF THEIR FUNCTIONAL PROPERTIES

Švedas V. K., Suplatov D. A., Panin N. V., Guranda D. T.

Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow 119991, Lenin Hills 1, Bldg.73, e-mail: vytas@belozersky.msu.ru

The possibilities of using methods of bioinformatics, molecular modeling and protein engineering to search for ways of modulating the functional properties of enzymes, as well as creating a unified technological platform for solving this problem are discussed.

**Key words:** enzyme engineering, modulation of enzyme properties, rational design

Recent years have seen a renewed interest in enzymes. Demonstration of promiscuous catalytic activities along with the long-known function for a number of enzymes (the phenomenon of moonlighting), the discovery of the functional role of enzymes that have lost the basic function (the study of the role of so-called pseudoenzymes), the emergence of an increasing amount of data indicating that allosteric regulation may be inherent not just to separate, but practically all enzymes - all these facts point to new opportunities for their practical use. Application of interdisciplinary approaches within the framework of a single platform that allows to combine the possibilities of bioinformatics, molecular modeling, theoretical chemistry, protein and genetic engineering can greatly accelerate this process [1-4]. The report will summarize the laboratory's experience in creating and using such a platform in

two areas: to create biocatalysts with improved properties, as well as for the design of new medicines.

The task of modulating the functional properties of enzymes can be solved in two ways - by changing the structure of the protein, and also as a result of the interaction of the enzyme with the modulating molecules. Until recently, in the design of drugs, the main targets were active sites of enzyme in order to search for competitive inhibitors that prevent the binding of substrates and cofactors. In recent years, it has become clear that in the structure of enzymes, along with well annotated active centers, there are a significant number of cavities and binding sites, the functional role of which is unknown. To understand whether such centers can be used to solve practical problems, it is necessary to identify them, characterize and establish a possible role in the modulation of the function. To solve these problems, we propose to use a methodology combining the possibilities of bioinformatics and molecular modeling, which is currently implemented in the form of 4 public servers. The developed methodology was tested in the search for ways of modulating the activity, selectivity and stability of enzymes of different families, as well as identifying previously unknown binding sites in the structure of enzymes for binding modulating ligands. The application of the method allowed to increase the stability and synthetic activity of penicillin acylase, expand the substrate specificity of D-aminopeptidase and impart amidase activity to lipase, and also to find specific inhibitors of a number of enzymes of pathogens [5,6].

The research was supported by the Russian Science Foundation (grant 15-14-00069-P)

#### References:

1. Suplatov D., Kopylov K., Popova N., Voevodin V., Švedas V. *Mustguseal: Server for Multiple Structure-Guided Sequence Alignments of Protein Families* // *Bioinformatics*. – 2018. – DOI:10.1093/bioinformatics/btx831.
2. Suplatov D., Sharapova Y., Timonina D., Kopylov K., Švedas V. *The visualCMAT: a web-server to select and interpret correlated mutations/co-evolving residues in protein families* // *J. Bioinform. Comput. Biol.* – 2018. – DOI: 10.1142/S021972001840005X
3. Suplatov D., Kirilin E., Takhaveev V., Švedas V. *Zebra: a web server for bioinformatic analysis of diverse protein families* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2014. – Vol. 32. – №. 11. – P. 1752-1758.
4. Suplatov D., Kirilin E., Arbatsky M., Takhaveev V., Švedas V. *pocketZebra: a web-server for automated selection and classification of subfamily-specific binding sites by bioinformatic analysis of diverse protein families* // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – №. W1. – P. W344-W349.
5. Shcherbakova T., Panin N., Suplatov D., Shapovalova I., Švedas V. *The  $\beta$ D484N mutant of penicillin acylase from Escherichia coli is more resistant to inactivation by substrates and can effectively perform peptide synthesis in aqueous medium* // *J. Mol. Catal. B Enzym.* – 2015. – Vol. 112. – P. 66–68.
6. Suplatov D., Panin N., Kirilin E., Shcherbakova T., Kudryavtsev P., Švedas V. *Computational design of a pH stable enzyme: understanding molecular mechanism of penicillin acylase's adaptation to alkaline conditions* // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol.9. - # 6. - e100643.

## СКРИНИНГ БИОРАЗНООБРАЗИЯ

**А.Г. Габиров**

*Институт биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН*

Разработаны чувствительные системы обнаружения новых клонов для создания высокопроизводительных скрининг-платформ.

**Ключевые слова:** микрофлюидный скрининг, аутокринный скрининг

Комбинаторная химия и биология стали отличительной чертой науки о жизни в XXI веке. Для скрининга больших репертуаров белков и клеточных клонов необходимо разработать чувствительные системы обнаружения новых клонов и создать высокопроизводительные скрининг-платформы. Мы разработали микрофлюидные подходы для скрининга микробиоты, биокаталитических клонов, разнообразия антител и специфических химерных антигенных рецепторов (CAR therapy). Этот подход рассмотрен для эффективного и безопасного лечения фолликулярной лимфомы. Поскольку лимфома обладает клональной злокачественностью, каждая опухоль имеет на поверхности клетки различные специфические антитела. Мы разработали принципы комбинаторного аутокринного скрининга. Из пептидной библиотеки находятся антигенные пептиды к В-клеточным рецепторам на поверхности опухолевых клеток. Выбранные лиганды используются в формате CAR-T (химерных T рецепторов) для перепрограммирования цитолитических лимфоцитов человека (CTL). Методы сверхвысокопроизводительного скрининга могут помочь идентифицировать уникальную функциональность клеток из миллионов вариантов. В *in vivo*

варианте мы разработали метод, основанный на одноклеточной инкапсуляции в каплях монодисперсной микрожидкостной двойной эмульсии, вода-масло- вода (MDE). Биосовместимый MDE метод позволяет выращивать капли, содержащие различные клоны. Комбинация капельного оборудования с проточной цитофлуориметрией FACS с последующим полногеномным секвенированием и жидкостной хроматографией-масс-спектрометрическим анализом секретов инкапсулированных организмов дала подробные описания генотипа / фенотипа ряда микроорганизмов. Эта платформа была протестирована с биофармацевтическими препаратами, экспрессированными на поверхности дрожжевых клеток. Было достигнуто обогащение, близкое к теоретическому пределу. Универсальность соединения была идентифицирована как обладающая ингибирующей активностью, включая медленно растущие виды микроорганизмов, которые подавляют рост общего патогена, *Staphylococcus aureus*. Выбор *in vitro* антител из больших репертуаров с использованием комбинаторных библиотек является мощным инструментом, обладающим большим потенциалом для создания акцепторов для токсинов. Мы предложили имитировать стадии созревания антител с помощью виртуального скрининга виртуальных библиотек. Мы достигли этой цели с помощью квантовой механики / молекулярной механики (QM / MM).

При поддержке Гранта Министерства образования и науки Российской Федерации N RFMEFI60716X0145

## SCREENING OF BIODIVERSITY

**A.G. Gabibov**

*Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic chemistry, Russian Academy of Sciences*

Designing sensitive detection systems and screening platforms.

**Key words:** CARs, uHTS

Combinatorial chemistry and biology became a hallmark of life science in XXI century. To screen large repertoires of proteins and cell clones we need to design sensitive detection systems and screening platforms. We developed microfluidic approaches for screening microbiota, biocatalytic clones, antibody diversity and specific chimeric antigen receptors (CARs). We report the development of a novel platform to significantly enhance the efficacy and safety of Follicular lymphoma treatment. Since lymphoma is a clonal malignancy of a diversity system every tumor has a different antibody on its cell surface. Combinatorial autocrine-based selection is used to rapidly identify specific ligands for these B cell receptors on the surface of FL tumor cells. The selected ligands are used in a CAR-T format for redirection of human CTLs. Essentially, the format is the inverse of the usual CAR-T protocol. Ultra-high-throughput screening (uHTS) techniques can identify unique functionality from millions of variants. To mimic the natural selection mechanisms that occur by compartmentalization *in vivo*, we developed a technique based on single-cell encapsulation in droplets of a monodisperse microfluidic double water-in-oil-in-water emulsion (MDE). Biocompatible MDE enables in-droplet cultivation of different living species. The combination of droplet-generating machinery with FACS followed by next-generation sequencing and liquid chromatography-mass spectrometry analysis of the secretomes of encapsulated organisms yielded detailed genotype/phenotype descriptions. This platform was probed with uHTS for biocatalysts anchored to yeast with enrichment close to the theoretically calculated limit and cell-to-cell interactions. The versatility of the platform allowed the identification of bacteria, including slow-growing oral microbiota species that suppress the growth of a common pathogen, *Staphylococcus aureus*, and predicted which genera were associated with inhibitory activity. Next, we developed a novel platform for maturation of antibody molecule in silica. *In vitro* selection of antibodies from large repertoires of immunoglobulin (Ig) combining sites using combinatorial libraries is a powerful tool, with great potential for generating *in vivo* scavengers for toxins. However, addition of a maturation function is necessary to enable these selected antibodies to more closely mimic the full mammalian immune response. We approached this goal using quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations to achieve maturation *in silico*.

Supported by the Grant from Ministry of Education and Science of Russian Federation N RFMEFI60716X0145

УДК 615.074

## ЦИФРОВАЯ ПРЕЦИЗИОННАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ МЕТАБОЛОМИКИ

Лохов П.Г., Лисица А.В., Арчаков А.И.

ФГБНУ "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича"  
119121, Москва, Погодинская ул., д. 10, стр. 8  
e-mail: lokhovpg@rambler.ru

Анализ метаболома биологических жидкостей человека позволяет выявлять различные патологии с точностью более 90%, тем самым обеспечивая основы для прецизионной диагностики заболеваний.

**Ключевые слова:** диагностика заболеваний, метаболомика, прецизионная медицина

При метаболомном анализе происходит измерение низкомолекулярных веществ (<1000Да) биологического объекта, формирующих его метаболом. Низкомолекулярными веществами являются субстраты и продукты почти всех биохимических реакций, происходящих в организме. Поэтому в метаболоме, как в "молекулярном зеркале" отражаются все существующие в организме патологии и риски их возникновения. Накопленные научные данные показывают, что метаболом биологических жидкостей человека позволяет выявлять различные патологии с точностью более 90%, тем самым обеспечивая основы для прецизионной диагностики заболеваний.

В докладе представлены основные определения, принятые в метаболомике, рассмотрены научные и методические проблемы внедрения метаболомного анализа в медицину, показано, что может являться «метаболомом человека» с медицинской точки зрения. Особое внимание уделено тому, что соответствует в метаболоме понятию «здоровье», отклонения от которого – есть проявление на молекулярном уровне представленных в организме патологий и рисков развития заболеваний. Подробно рассмотрены способы оцифровки метаболома человека и получения нормативных значений содержания метаболитов в организме человека, как неотъемлемой части создания цифрового образа здорового человека.

В докладе также освещены пути адаптации международных стандартов метаболомных исследований к стандартам клинической лабораторной практики. Показаны пути повышения достоверности результатов метаболомного исследования с целью перехода от классического для науки метаболомного исследования типа "случай-контроль", реализуемого на выборках пациентов, к персонализированному варианту метаболомного исследования. Продемонстрированы варианты применения подобного анализа в прецизионной диагностике заболеваний посредством трансляции в медицинскую практику всего накопленного объема метаболомных данных, среди которых данные о нормальном метаболизме человека (описано 88 метаболических путей), данные по изменению метаболической картины крови человека при более чем 400 заболеваниях (входят социально значимые заболевания), данные по изменению концентрации метаболитов при нуклеотидном полиморфизме (4500 вариантов), данные по метаболической картине при нарушении функции более чем 900 ферментов, участвующих в метаболизме человека.



UDC 615.074

## DIGITAL PRECISION DIAGNOSTICS OF DISEASES BASED ON METABOLOMICS

**Lokhov P.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I.***Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya st. 10/8, 119121, Moscow  
e-mail: lokhovpg@rambler.ru*

Analysis of the metabolome of human biological fluids allows detecting various pathologies with an accuracy of more than 90%, thereby providing the basis for a precision diagnosis of diseases.

**Key words:** diagnostics of diseases, metabolomics, precision medicine

With metabolic analysis, low-molecular-weight substances (<1000 Da) of a biological object, which form metabolome, are measured. Low-molecular-weight substances are the substrates and products of almost all biochemical reactions occurring in the body. Therefore, in the metabolome, as in the «molecular mirror», all the pathologies existing in the body and the risks of their occurrence are reflected. Accumulated scientific data show that the metabolic of human biological fluids allows detecting various pathologies with an accuracy of more than 90%, thereby providing the basis for a precise diagnosis of diseases.

The report presents the main definitions in metabolomics, highlights the scientific and methodological problems of the implementation of metabolic analysis in medicine; it is shown that it can be a «human metabolome» from a medical point of view. Particular attention is paid to the fact that the notion of «health» corresponds in the metabolome, the deviation from which is a manifestation at the molecular level of the pathologies and risks of the development of diseases presented in the organism. The methods of digitizing human metabolome and measuring of the reference values of the metabolites content in the human body as an integral part of creating a digital image of a healthy person are considered in details.

The report also highlights the ways of adapting international standards for metabolomics research to the standards of clinical laboratory practice. The ways of increasing the reliability of metabolic research results are shown with the purpose of translation from a classical for scientific metabolomics study of the «case-control» type, realized on the sets of patient samples, to a personalized type of the metabolomics study. The use of such an analysis in the precision diagnosis of diseases is demonstrated by translating into medical practice all the accumulated metabolomics data, including data on normal human metabolism (described in 88 metabolic pathways), data on changes in the metabolic pattern of human blood in more than 400 diseases (includes socially significant diseases), data on the change in the concentration of metabolites induced by the nucleotide polymorphism (4500 variants), data on the metabolic pattern at the dysfunction of more than 900 enzymes involved in human metabolism.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ НАДОРГАНИЗМЕННЫХ СИСТЕМ

### BIOTECHNOLOGY OF SUPRA ORGANISMAL SYSTEMS

1. АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МХА <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i> ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ, Сухих Н.А., Добрынин П.В., Егорова Е.Д., Предеус А.В., Виноградова С.В., .....	16
DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION ANALYSIS OF THE MOSS <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i> UNDER DIFFERENT CONDITIONS, Sukhikh N.A., Dobrynin P.V., Egorova E.D., Predeus A.V., Vinogradova S.V. ....	17
2. БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА МИКОГЕРБИЦИДОВ, Сокоорнова С.В., Фролова Г.М., Павлова Н.А., Берестецкий А.О. ....	18
SOME BIOCHEMICAL MARKERS FOR QUALITY EVALUATION OF MYCOHERBICIDE INFECTION MATERIALS, Sokornova S.V., Bogomaz O.D., Matveeva T.V. ....	19
3. ВЛИЯНИЕ НИКЕЛЯ НА ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНОВ КОБАЛЬТ-ЗАВИСИМОЙ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ И НА ЕЁ БИОСИНТЕЗ В <i>RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS</i> , А.О.Шемякина, Е.Г.Гречишникова, К.В.Лавров, А.Д.Новиков, Т.И.Калинина, А.С.Яненко .....	20
THE INFLUENCE OF NICKEL ON THE TRANSCRIPTION OF THE COBALT-DEPENDENT NITRILE HYDRATASE GENES AND ON ITS BIOSYNTHESIS IN <i>RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS</i> , A.Shemyakina, E.Grechishnikova, K.Lavrov, A.Novikov, T.Kalinina, A.Yanenko .....	21
4. ВОЗРАСТНЫЕ ОТЛИЧИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОСТАВА РУБЦА СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ РОССИЙСКОЙ АРКТИКИ, Л.А. Ильина, Г.Ю. Лаптев, Е.А. Йылдырым, В. А. Филиппова, Т.П. Дуняшев, А.В. Дубровин, К.А. Лайшев .....	22
AGE DIFFERENCES OF REINDEER RUMEN BACTERIAL COMPOSITION IN RUSSIAN ARCTIC, L.A. Iliina, G.Yu. Laptev, E.A. Yildirim, VA Filippova, T.P. Dunyashev, A.V. Dubrowin, K.A. Laishev .....	23
5. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ГОРОХА ПОСЕВНОГО ( <i>PISUM SATIVUM L.</i> ), Сулима А.С., Жуков В.А., Афонин А.М., Тихонович И.А. ....	24
GENETIC BASIS FOR CONSTRUCTION OF HIGH-SPECIFIC SYMBIOTIC SYSTEMS OF GARDEN PEA ( <i>PISUM SATIVUM L.</i> ), Sulima A.S., Zhukov V.A., Afonin A.M., Tikhonovich I.A. ....	25
6. ГЕНОМИКА И ТРАНСКРИПТОМИКА СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ, ОБРАЗУЕМЫХ ГОРОХОМ ПОСЕВНЫМ ( <i>PISUM SATIVUM L.</i> ), Жуков В.А., Афонин А.М., Жернаков А.И., Кулаева О.А., Сулима А.С., Тихонович И.А. ....	26
GENOMICS AND TRANSCRIPTOMICS OF GARDEN PEA ( <i>PISUM SATIVUM L.</i> ) SYMBIOTIC SYSTEMS, Zhukov V.A., Afonin A.M., Zhernakov A.I., Kulaeva O.A., Sulima A.S., Tikhonovich I.A. ....	28
7. ГЕНЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПАТОГЕНА И ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЯ КАК ФАКТОРЫ КОЛОНИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ФИТОФТОРОЗА <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> , Мартынов В.В., Соколова Е.А., Чижик В.К., Кузнецова М.А., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. ....	29
PATHOGEN VIRULENCE GENES AND PLANT RESISTANCE GENES AS FACTORS OF POTATO PLANT COLONIZATION BY LATE BLIGHT INFECTION AGENT <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i> , Martynov V.V., Sokolova E.A., Chizhik V.K., Kuznetsova M.A., Rogozina E.V., Khavkin E.E. ....	29
8. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ <i>ESTUT1</i> БАКТЕРИИ <i>UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS</i> И БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ЕЕ ОСНОВЕ, Сорокина К.Н., Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Пармон В.Н. ....	30
STUDY OF THE PROPERTIES OF THE THERMOSTABLE ESTERASE <i>ESTUT1</i> OF <i>UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS</i> AND THE BIOCATALYST PREPARED FROM IT, Sorokina K.N., Samoylova Yu.V., Piligaev A.V., Parmon V.N. ....	31
9. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИ(2-ПИРИДИЛ-1-ОКСИД)ДИСЕЛЕНИДА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ <i>A. ORYZAE</i> , Залепкина С. А., Смирнов В. Ф., Артемьева М. М. ....	31
RESEARCH ON THE EFFECT OF BIS(2-PYRIDINE-N-OXIDE) DISELENIDE ON <i>A. ORYZAE</i> GENE EXPRESSION LEVEL, Zalepkina S.A., Smirnov V.F., Artemyeva M.M. ....	32
10. ОЦЕНКА РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОФУНГИЦИДОВ, Каримова Л.З., Валидов Ш.З., Сафин Р.И. ....	33
THE EVALUATION OF VARIOUS SOURCES OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS FOR NEW BIOFUNGICIDES,	

Karimova L.Z., Validov S.Z., Safin R.I. ....	34
11. ПРИРОДНО-ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ LINARIA VULGARIS, КАК ИСТОЧНИК ИРИДОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ, Сокорнова С.В., Богомаз О.Д., Матвеева Т.В., Sokornova S.V., Bogomaz O.D., Matveeva T.V. ....	35
NATURALLY TRANSGENIC PLANT LINARIA VULGARIS AS A SOURCE OF IRIDOID GLYCOSIDES, Sokornova S.V., Bogomaz O.D., Matveeva T.V. ....	36
12. ПРОФИЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ PARIETECHLORIS SP. ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, А.И.Голубева, Г.Б.Бутаева, М.Петрушкина, Б.Сорокин, А.Филимонова, Н.Зотько, З.Намсараев, Д.Кузьмин, Е.Гусев, Е.Мальцев ....	37
FATTY ACID PROFILE OF PARIETECHLORIS SP. UNDER DIFFERENT CULTURING CONDITIONS, A.Golubeva, G.Butaeva, M.Petrushkina, B.Sorokin, A.Filimonova, N.Zotko, Z.Namsaraev, D.Kuzmin, E.Gusev, Y.Maltsev ....	38
13. СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В ИЗУЧЕНИИ ПРИРОДНО-ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, Матвеева Т.В., Хафизова Г.В., Добрынин П.В., Полев Д.Е., Лутова Л.А. ....	39
NEXT GENERATION SEQUENCING IN THE INVESTIGATION OF NATURALLY TRANSGENIC PLANTS, Matveeva T.V., Khafizova G.V., Dobrynin P.V., Polev D.E., Lutoza L.A. ....	40
14. СОЛЕВОЙ СТРЕСС ГРИБА GANODERMA LUCIDUM: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ, М.С.Ярина, Л.М.Краснопольская, А.В.Марахнов, Я.Шипилов ....	41
SALT STRESS ON GANODERMA LUCIDUM: MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMISTRY ASPECTS, M.Yarina, L.Krasnopol'skaya, A.Marakhonov, Y.Shipilov ....	42

УДК 577.3

## АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МХА PHYSCOMITRELLA PATENS ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ

Сухих Н.А.<sup>1</sup>, Добрынин П.В.<sup>2</sup>, Егорова Е.Д.<sup>1</sup>, Предеус А.В.<sup>3</sup>, Виноградова С.В.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; Институт биоинженерии, Москва, Россия

<sup>2</sup> Центр геномной биоинформатики им. Ф.Г.Добржанского, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Институт биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

e-mail: svetlana.vinogradova@biengi.ac.ru

Моховидные или Бриофиты относятся к первым растениям, вышедшим на сушу около 450 млн. лет назад. В настоящее время мох *Physcomitrella patens* широко используется в качестве модельного организма в работах по изучению процессов эволюции растительных систем, а также при изучении генетических и физиологических аспектов развития растений. Целью данной работы является комплексный анализ полученных нами данных транскриптомного профайлинга мха, инокулированного фитопатогенами, а также ранее опубликованных транскриптомных данных.

**Ключевые слова:** *Physcomitrella patens*, мох, дифференциальная экспрессия генов

Мох *Physcomitrella patens* широко используется в работах по изучению процессов эволюции. В отличие от покрытосеменных растений, в жизненном цикле мхов преобладает стадия гаплоидного гаметофита. *P. patens* является уникальным модельным организмом для изучения механизмов адаптации растений в связи с его промежуточным положением между зелеными водорослями и покрытосеменными растениями. Целью данной работы является комплексный анализ полученных нами данных транскриптомного профайлинга мха, инокулированного фитопатогенами, а также ранее опубликованных транскриптомных данных.

Для изучения взаимодействия *P. patens* и фитопатогенов гаметофоры мха были инокулированы суспензиями бактерий родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*. На 5 день после инокуляции из гаметофоров была выделена РНК. Секвенирование кДНК библиотек проводили на секвенаторе SOLiD. Полученные риды картировали на геном и транскриптом мха в специализированных программах Bowtie и Tophat. При анализе представленности генов и их изоформ использовали программу RSEM.

В результате при секвенировании каждого образца было получено около 84 млн ридов длиной 50 п.н. Продукты большей части генов, экспрессия которых увеличилась в результате инокуляции бактериями

рода *Pseudomonas*, участвуют в процессинге белков и эндоцитозе, в то время как экспрессия генов, ответственных за метаболизм азота и гистидина, снизилась по сравнению с незараженными образцами. Что касается гаметофоров мха, инокулированных бактериями рода *Xanthomonas*, продукты большей части генов, экспрессия которых повысилась по сравнению с контрольными образцами, участвуют в процессах биогенеза рибосом, транспорта РНК, фотосинтеза и синтеза флавоноидов. При этом экспрессия генов, ответственных за метаболизм  $\alpha$ -Линоленовой кислоты, метаболизм глутатиона и азота, снизилась относительно контрольных образцов.

В настоящее время для анализа генных взаимодействий у мха *P. patens* нами проводится работа по созданию информационной базы, основанной на интеграции полученных нами и доступных из открытых источников транскриптомных данных. Нами были отобраны ранее опубликованные наборы транскриптомных данных *P. patens* в базах данных GEO ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) и ArrayExpress ([www.ebi.ac.uk/arrayexpress/](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/)). Сравнительный анализ транскриптомных профилей мха, полученных при различных условиях, используется нами для изучения экспрессии генов и сигнальных путей.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00822 мол\_а на базе Экспериментальной установки искусственного климата (регистрационный номер УНУ U-73547)

UDK 577.3

## DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION ANALYSIS OF THE MOSS PHYSCOMITRELLA PATENS UNDER DIFFERENT CONDITIONS

Sukhikh N.A.<sup>1</sup>, Dobrynin P.V.<sup>2</sup>, Egorova E.D.<sup>1</sup>, Predeus A.V.<sup>3</sup>, Vinogradova S.V.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of the RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics St.Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Institute of Bioinformatics, St. Petersburg, Russia

Bryophytes (liverworts, mosses and hornwort) are the earliest plants colonized the terrestrial environment about 450 million years ago. Nowadays the moss *Physcomitrella patens* is widely used as a model organism in studies of evolutionary processes, genetics and physiology. The aim of this study is complex analysis of high-throughput transcriptomic data from our study and publicly available transcriptomics data.

**Key words:** moss, *Physcomitrella patens*, differential gene expression

The moss *Physcomitrella patens* is widely used in studies of evolutionary processes. In contrast to the flowering plants, mosses have prevalent haploid gametophytic stage in their life cycle. *P. patens* is an interesting model organism for exploring the mechanisms of plant adaptation due to its evolutionary stage between green algae and flowering plants. The aim of this study is complex analysis of high-throughput transcriptomic data of moss *P. patens* inoculated with biotrophic plant pathogens from our study and publicly available transcriptomic data.

For this purpose, we inoculated moss gametophores with *Pseudomonas* and *Xanthomonas* bacteria. Five days post inoculation gametophores were grinded and RNA was extracted. Sequencing of cDNA libraries was performed on SOLiD sequencing platform. Reads were mapped to the genome and transcriptome of *P. patens* using Bowtie and Tophat programs. RSEM was used for quantifying gene and isoform abundances.

About 84M of 50 bp reads were obtained for each sample. We showed that the majority of up-regulated by *Pseudomonas* inoculation genes encode protein processing and endocytosis, while down-regulated genes encode nitrogen metabolism, histidine metabolism and cyanoamino acid metabolism. As to *Xanthomonas*, the majority of up-regulated genes encode ribosome biogenesis, RNA transport, photosynthesis, and flavonoid biosynthesis, whereas down-regulated genes encode alpha-Linolenic acid metabolism, glutathione metabolism, and nitrogen metabolism.

Nowadays we have compiled a transcriptomic database for analysis of signaling networks in *P. patens*. We have collected previously published transcriptome datasets of *P. patens* from GEO ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) and ArrayExpress ([www.ebi.ac.uk/arrayexpress/](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/)). Comparative analysis of moss transcriptome profiles obtained under different biotic and abiotic conditions provided an opportunity for investigation of gene expression and molecular pathways.

This study was supported by RFBR, research project No. 18-34-00822 and was performed using the experimental climate control facility U-73547.

УДК 582.28

## БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА МИКОГЕРБИЦИДОВ

Сокорнова С.В., Фролова Г.М., Павлова Н.А., Берестецкий А.О.

Федеральное бюджетное государственное научное учреждение Всероссийский Институт Защиты Растений, Санкт-Петербург, Россия  
 196608, Санкт-Петербург, г. Пушкин, ш. Подбельского д. 3  
 e-mail: svokornova@vizr.spb.ru

Фомоидный микромицет *Stagonospora cirsi* – потенциальный микогербицид бодяка и осота. Целью работы был поиск дополнительных критериев, определяющих микогербицидные свойства мицелия этого гриба. Показано, что ими могут быть биохимические показатели. Например, замена в питательной среде неорганического источника азота на органический приводит к значительному увеличению выхода патогенного мицелия, характеризующегося высокой долей структурных липидов. Мицелий в стационарной фазе роста более устойчив к стресс-факторам, чем молодой инфекционный материал, и его можно охарактеризовать соотношением и количеством дисахаридов (трегалозы и сахарозы). Таким образом, при получении инфекционного материала с заданными свойствами могут быть использованы биохимические маркеры.

**Ключевые слова:** фомоидный патоген *Stagonospora cirsi*, структурные липиды, резервные липиды, трегалоза, сахароза, микогербицид, инфекционный материал, биохимические маркеры

Традиционно микогербициды выпускаются в двух формах жидкой (для краткосрочного хранения) и сухой (для долгосрочного хранения). К каждой препаративной форме кроме стандартных критериев (агрессивности, жизнеспособности) предъявляются дополнительные требования. Так для жидких форм ключевыми показателями являются простота получения и низкая стоимость ИМ. Важнейшим показателем качества препарата долгосрочного хранения является жизнеспособность ИМ в момент применения [1]. Достигаются эти показатели могут различными способами: скринингом патогенов, выбором формы ИМ, оптимизацией условий культивирования и состава препаративных форм [2]. В зависимости от состояния ИМ развитие болезни имеет свои особенности, в частности, различаясь по значимости ферментной системы и токсинов в патогенезе. Фомоидный микромицет *Stagonospora cirsi* – потенциальный микогербицид бодяка и осота, инфекционной основой которого является мицелий [3]. Стандартных критериев, а именно оценки вирулентности и жизнеспособности мицелия *S. cirsi*, оказалось недостаточно для прогнозирования эффективности в полевых условиях и устойчивости к высушиванию. Поиск дополнительных критериев, определяющих микогербицидные свойства мицелия *S. cirsi*, стал целью данной работы. Манипулируя источниками углерода и азота, а также продолжительностью культивирования можно влиять на микогербицидные свойства мицелия, что находит отражение в изменении его биохимических показателей. Например, замена в питательной среде неорганического источника азота на органический приводит к значительному увеличению выхода патогенного мицелия и его агрессивности, что сопровождается полукратным увеличением доли структурных липидов за счет сокращения резервных. Увеличение продолжительности культивирования позволяет получить более устойчивый к стресс-факторам мицелий, характеризующийся изменением в соотношении дисахаридов (трегалозы и сахарозы). Очевидно, что манипуляции с составом питательной среды оказывают воздействие и на другие факторы, определяющие микогербицидные свойства, такие как токсинообразование и ферментный комплекс [4]. В тоже время роль этих факторов в патогенезе сильно варьирует в зависимости от возраста мицелия, поэтому их необходимо рассматривать в рамках конкретной задачи. Таким образом, при оптимизации условий культивирования при получении ИМ с заданными свойствами целесообразно учитывать биохимические показатели.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант №16-16-00085

### Литература:

1. Берестецкий А.О., Сокорнова С.В. Получение и хранение биопестицидов на основе микромицетов // Микология и фитопатология. - 2009. – Т.43, № 6. - С. 473–489.
2. Bailey K.L. The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens // In: Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective. Ed. D. P. Abrol, Elsevier, San Diego, 2014. P. 245–266.
3. Патент РФ. № 2515899 С1, 20.05.2014.
4. Bailey K. L., Pitt W. M., Leggett F., Sheedy C., Derby J. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds // Biol. Control. 2011. Vol.59. P. 268–276.

UDC 582.28

## SOME BIOCHEMICAL MARKERS FOR QUALITY EVALUATION OF MYCOHERBICIDE INFECTION MATERIALS

Sokornova S.V., Bogomaz O.D., Matveeva T.V.

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia  
Universitetskaya emb, 7/9, St. Petersburg, Russia, 199034  
e-mail: s.sokornova@spbu.ru

Phoma-like micromycete *Stagonospora cirsi* is regarded as a potential mycoherbicide of Canada thistle and sow-thistle. The aim of the study was to search additional criteria defining its mycoherbicidal properties. It was showed that biochemical markers can be used for quality evaluation of mycoherbicide infection materials. For example, the replacement of inorganic nitrogen source to organic one strongly increases the yield of pathogenic mycelium, which is characterized by the elevated level of the structural lipids. The mycelium in stationary growth phase is more resistant to stress factors than more young infection material and it can be characterized by disaccharides (trehalose, sucrose) levels and ratios.

Thus, biochemical markers can be used for obtaining an infectious material with specific properties.

**Key words:** phoma-like fungi, *Stagonospora cirsi*, reserve lipids, structural lipids, trehalose, sucrose, mycoherbicide, infection materials, biochemical markers

Traditionally, mycobicides are available in liquid and solid formulations designed for short-term and long-term storage, respectively. Depending on the formulation the mycoherbicide infectious material (IM) should be characterized additionally. So, for liquid formulations, the key criteria are simple production and low cost of IM. The most important quality criterion of mycobicides designed for the long-term storage is the viability of IM at the time of application [1]. These indicators could be achieved by different approaches, including screening pathogens, selecting the form of IM, optimizing the cultivation condition and formulations [2]. Depending on the fitness of IM, the disease has its own peculiarities, and the contribution of toxins and enzymes in pathogenesis can be different. Phoma-like micromycete *Stagonospora cirsi* is regarded as a potential mycoherbicide of Canada thistle and sow-thistle, the infectious basis of which is a mycelium [3]. The standard criteria, namely, the virulence and viability of the mycelium *S. cirsi* were proved insufficient for predicting efficacy in the field and for the resistance to drying. The aim of the study was to search additional criteria defining its mycoherbicidal properties. Manipulating with the sources of carbon and nitrogen, as well as the duration of cultivation, can influence on mycoherbicidal properties of the mycelium, which in turn reflects in the change of biochemical parameters of mycelium. For example, the replacement of inorganic nitrogen source to organic one strongly increases the yield of pathogenic mycelium, which results in a one and a half increase of the proportion of structural lipids due to a reduction of reserve ones. An increase in the duration of cultivation makes it possible to obtain a more resistant to stress factors mycelium, characterized by a change in the ratio of disaccharides (trehalose, sucrose). Obviously, manipulations with the composition of the nutrient medium have an effect on other factors, determining mycoherbicidal properties, such as toxin formation and enzyme complex [4]. At the same time, the role of these factors in pathogenesis greatly varies, depending on the age of the mycelium, so they must be considered within the framework of a specific task. Thus, biochemical markers can be used for obtaining an infectious material with specific properties.

This work was supported by RSF grant 16-16-00085.

### References:

1. Berestetskiy A.O., Sokornova S.V. Production and stabilization of mycopesticides. *Mikologiya i Fitopatologiya*. 2009. V. 43. N 6. P. 473–489.
2. Bailey K.L. The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens // In: *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*. Ed. D.P. Abrol, Elsevier, San Diego, 2014. P. 245–266.
3. Patent RU. № 2515899 C1, 20.05.2014.
4. Bailey K. L., Pitt W. M., Leggett F., Sheedy C., Derby J. Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds // *Biol. Control*. 2011. Vol.59. P. 268–276.
5. УДК: 581.1:581.2:633.491:631.524:

УДК: 577.11.083

## ВЛИЯНИЕ НИКЕЛЯ НА ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНОВ КОБАЛЬТ-ЗАВИСИМОЙ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ И НА ЕЁ БИОСИНТЕЗ В RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS

А.О.Шемякина, Е.Г.Гречишникова, К.В.Лавров, А.Д.Новиков, Т.И.Калинина, А.С.Яненко

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, 1, haletod@rambler.ru, 89150679618

Никель способен индуцировать транскрипцию генов кобальт-зависимой нитрилгидратазы аналогично кобальту в штаммах *R. rhodochrous* M8, M33, J1. Присутствие никеля существенно снижает концентрацию активной формы нитрилгидратазы в клетках *R. rhodochrous*.

**Ключевые слова:** нитрилгидратаза, кобальт, никель, экспрессия генов, акриламид, *Rhodococcus*.

Фермент кобальт-зависимая нитрилгидратаза (Co-НГ) катализирует превращение акрилонитрила в акриламид. Для производства последнего в промышленных масштабах (ок. 800 млн. т. в России и мире) используется биокатализатор – бактерии *Rhodococcus rhodochrous*, содержащие Co-НГ. В России разработан и применяется для этой цели штамм *R. rhodochrous* M8 и его производные [1].

Высокоэффективная экспрессия (биосинтез) Co-НГ в клетках *Rhodococcus* подтверждена сложной, малоизученной регуляцией. Изучение регуляторных механизмов необходимо для создания фундаментальной основы для конструирования широкого круга биокатализаторов на основе бактерий *Rhodococcus*. В частности, для экспрессии НГ необходимы ионы кобальта, используемые как для активации транскрипции генов НГ, так и для биосинтеза активного фермента (фермент активен, только если кобальт координирован в активном центре) [2], [3]. Известно, что металло-зависимые регуляторные механизмы у бактерий обладают различными уровнями специфичности по отношению к требуемым для них ионам. В настоящей работе металло-специфичность двух кобальт-зависимых систем – транскрипции и биосинтеза активной НГ – была впервые протестирована *in vivo* ионами никеля, очень сходными с ионами кобальта, а также с ионами других тяжёлых металлов.

Изучение эффекта ионов Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, As<sup>3+</sup> (при не подавляющих рост концентрациях) показало, что только ионы никеля активируют транскрипцию генов НГ аналогично ионам кобальта в штаммах *R. rhodochrous* M8 [4], M33 [5], J1 [6], M33 aam [7] (по данным RT-qPCR и активности металло-независимого репортёрного фермента ациламидазы [8]). Однако для сравнимого с кобальтом уровня активации транскрипции необходима в 30 раз большая концентрация никеля. Изучение экспрессии в делеционных вариантах кассеты с промотором НГ показало, что оба иона активируют транскрипцию с помощью гена металло-зависимого транскрипционного регулятора *cblA* [3], без участия гена кобальтового металлошаперона *nhmG*.

При выращивании *R. rhodochrous* с никелем, в отсутствие кобальта, фермент НГ синтезируется (по данным SDS-ПААГ электрофореза), но полностью неактивен. В присутствии обоих ионов, никель вдвое снижает удельную НГ активность клеток, если он добавлен в среду в 10-кратном избытке по отношению к кобальту. Снижается также и количество белка НГ, детектируемое на SDS-ПААГ электрофорезе. В случае равенства концентраций обоих ионов никель не оказывает действия на активность и количество белка.

Показано, что кобальт-зависимые механизмы регуляции транскрипции и синтеза активной НГ обладают относительно высоким уровнем специфичности *in vivo* по отношению к ионам кобальта. Очень сходные с кобальтом ионы никеля способны действовать аналогичным с ионами кобальта образом только при превышении концентрации на порядок. Другие ионы тяжёлых металлов не способны влиять на работу этих механизмов (при не подавляющих рост концентрациях).

### Литература:

1. Leonova T. E., Astaurova O. B., Ryabchenko L. E., Yanenko A. S. Nitrile hydratase of *Rhodococcus*. Optimization of synthesis in cells and industrial applications for acrylamide production // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2000. – V.88, № 1-3. – P. 231-241.
2. Pogorelova T. E., Ryabchenko L. E., Sunzov N. I., Yanenko A. S. Cobalt-dependent transcription of the nitrile hydratase gene in *Rhodococcus rhodochrous* M8 // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1996. – V. 144, № 2-3. – P. 191-195.
3. Lavrov K. V., Novikov A. D., Kalinina T. I., Shemyakina A. O., Grechishnikova E. G., Ryabchenko L. E., Yanenko A. S. New *cblA* gene participates in regulation of cobalt-dependent expression of nitrile hydratase genes in

*Rhodococcus rhodochrous* // *Research in Microbiology*. – текст публикации в печати. 4. Астаурова О. Б., Погорелова Т. Е., Фомина О. Р., Полякова И. Н., Яненко А. С. Регуляция биосинтеза ферментов биодegradации нитрилов у *Rhodococcus rhodochrous* MO // *Биотехнология*. – 1991. – №5. – С. 10-14. 5. Патент №2053300 Российская Федерация. Штамм бактерий *Rhodococcus rhodochrous* – продуцент нитрилгидратазы / Яненко А. С., Астаурова О. Б., Воронин С. П., Герасимова Т. В., Кирсанов Н. Б., Пауков В. Н., Полякова И. Н., Дебабов В. Г.; заявитель и патентообладатель ФГУП «ГосНИИгенетика» – № 93056089/13; заявл. 17.12.1993; опубл. 27.01.1996. с.9. 6. Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over // *Trends in Biotechnology*. – 1992. – V. 10. – P. 402-408. 7. Патент №2539033 Российская Федерация. Рекомбинантный штамм бактерий *Rhodococcus rhodochrous*, обладающий конститутивной ацилирующей активностью, и способ синтеза N-замещенных акриламидов с использованием этого штамма в качестве биокатализатора. / Лавров К. В., Новиков А. Д., Рябченко Л. Е., Герасимова Т. В., Яненко А. С.; заявитель и патентообладатель ФГУП «ГосНИИгенетика» – № 2013146666/10; заявл. 21.10.2013; опубл. 10.01.2015, Бюл. № 1 – с.8. 8. Лавров К. В., Залуни И. А., Котлова Е. К., Яненко А. С. Новая ациламидаза из *Rhodococcus erythropolis* TA37, способная гидролизовать N-замещенные амиды // *Биохимия*. – 2010. – Т. 75, № 8. – С. 1006-1013.

**Финансирование:** Работа была выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (соглашение № 16-14-00216 «Изучение системы кобальт-зависимой экспрессии генов в бактериях *Rhodococcus* и создание на её основе платформы для биосинтеза ферментов – биокатализаторов для получения акриловых мономеров»).

UDC 577.11.083

## THE INFLUENCE OF NICKEL ON THE TRANSCRIPTION OF THE COBALT-DEPENDENT NITRILE HYDRATASE GENES AND ON ITS BIOSYNTHESIS IN RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS

A.Shemyakina, E.Grechishnikova, K.Lavrov, A.Novikov, T.Kalinina, A.Yanenko

Federal Institution «State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center» Kurchatov Institute», Russia, 117545, Moscow, 1-st Dorozhny pr., 1

Nickel is capable of inducing transcription of cobalt dependent nitrile hydratase genes similarly to cobalt in strains *R. rhodochrous* M8, M33, J1. The presence of nickel significantly reduces the concentration of the active form of nitrile hydratase in *R. rhodochrous* cells.

**Key words:** nitrile hydratase, cobalt, nickel, gene expression, acrylamide, *Rhodococcus*.

The cobalt-dependent nitrile hydratase enzyme (Co-NHase) catalyzes the conversion of acrylonitrile to acrylamide. To produce the latter on an industrial scale (about 800 million tons in Russia and in the world) a biocatalyst – *Rhodococcus rhodochrous* bacteria containing NHase – is used. In Russia, the strain *R. rhodochrous* M8 and its derivatives have been developed and used for this purpose [1].

The highly effective expression (biosynthesis) of Co-NHase in *Rhodococcus* cells is subjected to a complex, insufficiently studied regulation. The study of regulatory mechanisms is necessary to create a fundamental basis for the design of a wide range of biocatalysts based on *Rhodococcus* bacteria. In particular, cobalt ions are required for the NHase expression, where they are used both for activation of NHase genes transcription and for the biosynthesis of the active enzyme (the enzyme is active only if cobalt is coordinated in the active site) [2], [3]. It is known that the metal-dependent regulatory mechanisms in bacteria have different levels of specificity with respect to the ions required for them. In the present work, the metal specificity of the two cobalt-dependent systems – transcription and biosynthesis of active NHase – was studied for the first time in vivo with nickel ions very similar to cobalt ions, as well as with the ions of other heavy metals.

The study on the Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, As<sup>3+</sup>-ions effect (in non-inhibitory concentrations) showed that only nickel ions activate transcription of NHase genes similarly to cobalt ions in strains *R. rhodochrous* M8 [4], M33 [5], J1 [6], M33 aam [7] (according to RT-qPCR data and the activity of the non-metal-dependent reporter enzyme acylamidase [8]). However, 30-fold higher concentration of nickel was necessary to obtain the level of transcription comparable to that of obtained with cobalt. The studies on the expression of the deletion variants of the cassette with the NHase promoter showed that both ions activate transcription via the metal-dependent transcriptional regulator gene *cbIA* [3], without the participation of the cobalt metallochaperone gene *nhmG*.

When *R. rhodochrous* was grown with nickel and in the absence of cobalt, the NHase enzyme was synthesized (according to SDS-PAGE), although in completely inactive form. In the presence of both ions, nickel caused 2-fold



decrease in the specific NHase activity of cells being added to the medium in 10 fold excess relative to cobalt. The amount of NHase protein detected on SDS-PAGE also decreases in this case. In the case of equal concentrations of both ions, nickel does not affect the activity and the amount of the protein.

It was shown that both cobalt-dependent mechanisms of regulation of transcription and synthesis of active NHase have a relatively high level of specificity *in vivo* with respect to cobalt ions. Being very similar to cobalt, nickel ions are able to act in an analogous manner as cobalt ions only when their concentration is exceeded by an order of magnitude. The ions of other heavy metals were not able to influence the operation of these mechanisms (in non-inhibitory concentrations).

References:

1. Leonova T. E., Astaurova O. B., Ryabchenko L. E., Yanenko A. S. Nitrile hydratase of *Rhodococcus*. Optimization of synthesis in cells and industrial applications for acrylamide production // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2000. – V.88, № 1-3. – P. 231-241.
2. Pogorelova T. E., Ryabchenko L. E., Sunzov N. I., Yanenko A. S. Cobalt-dependent transcription of the nitrile hydratase gene in *Rhodococcus rhodochrous* M8 // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1996. – V. 144, № 2-3. – P. 191-195.
3. Lavrov K. V., Novikov A. D., Kalinina T. I., Shemyakina A. O., Grechishnikova E. G., Riabchenko L. E., Yanenko A. S. New *cblA* gene participates in regulation of cobalt-dependent expression of nitrile hydratase genes in *Rhodococcus rhodochrous* // *Research in Microbiology*. – in press.
4. Astaurova O. B., Pogorelova T. E., Fomina O.R., Polyakova I. N., Yanenko A. S. Regulation of biosynthesis of nitrile biodegradation enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* MO // *Biotechnology*. – 1991. – №5. – P. 10-14.
5. Patent № 2053300 of the Russian Federation. Strain of *Rhodococcus rhodochrous* bacteria – producer of nitrile hydratase / Yanenko A. S., Astaurova O. B., Voronin S. P., Gerasimova T. V., Kirsanov N. B., Paukov V. N., Polyakova I. N., Debabov V. G.; the applicant and the patent holder FSUE «GosNIIgenetika» – № 93056089/13; claimed 17.12.1993; publ. 01/27/1996. – P.9.
6. Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over // *Trends in Biotechnology*. – 1992. – V. 10. – P. 402-408.
7. Patent № 2539033 of the Russian Federation. A recombinant strain of *Rhodococcus rhodochrous* bacteria having a constitutive acylating activity and a method for synthesizing N-substituted acrylamides using this strain as a biocatalyst. / Lavrov K. V., Novikov A. D., Ryabchenko L. E., Gerasimova T. V., Yanenko A. S.; the applicant and the patent holder FSUE «GosNIIgenetika» – №. 2013146666/10; claimed 10/21/2013; publ. 01/10/2015, bulletin № 1 – P.8.
8. Lavrov K. V., Zalunin I. A., Kotlova E. K., Yanenko A. S. A new acylamidase from *Rhodococcus erythropolis* TA37 can hydrolyze N-substituted amides // *Biochemistry*. – 2010. – V. 75, № 8. – P. 1006-1013.

**Grant:** This work was supported by Russian Science Foundation (project №16-14-00216 “Study on cobalt-dependent gene expression in *Rhodococcus* Bacteria and construction on its basis of a platform for biosynthesis of enzyme biocatalysts for obtaining of acrylic monomers”).

УДК 576.64

## ВОЗРАСТНЫЕ ОТЛИЧИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОСТАВА РУБЦА СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ РОССИЙСКОЙ АРКТИКИ

Л.А. Ильина, Г.Ю. Лаптев, Е.А. Йылдырым, В. А. Филиппова, Т.П. Дуняшев, А.В. Дубровин, К.А. Лайшев

Общество с ограниченной ответственностью «БИОТРОФ+», Россия, 196602, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, ул. Малиновская, д 8. лит. А, пом. 7-Н  
e-mail: [ilina@biotrof.ru](mailto:ilina@biotrof.ru)

Впервые представлены результаты сравнительного анализа состава бактериального сообщества рубца телят, молодняка и взрослых особей северных оленей *Rangifer tarandus* Российской Арктики.

**Ключевые слова:** северные олени, *Rangifer tarandus*, микробиом рубца, бактериальное сообщество, молекулярно-генетические методы, T-RFLP-анализ.

Важную роль в жизнедеятельности *Rangifer tarandus* играют микроорганизмы-симбионты рубца, позволяющие животным эффективно использовать скудные питательные ресурсы тундры и лесотундры [1]. Однако микробное сообщество рубца северных оленей, а также его возрастные изменения являются наименее изученными по сравнению с другими жвачными.

В настоящем исследовании впервые был проведен сравнительный анализ состава бактериального сообщества рубца телят (4 месяца), молодняка (1-2 года) и взрослых особей (3-6 лет) *Rangifer tarandus*, обитающих в Ямало-Ненецком автономном округе. Исследование выполнено в лаборатории компании «БИОТРОФ+» с использованием метода T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) [3].

В результате исследования установлено, что большая часть фило типов относилась к филуму Firmicutes,

в меньшей степени – Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria, в минорном количестве - Tenericutes и Fusobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria. Практически полностью отсутствовали целлюлозолитические бактерии семейства Ruminococcaceae, традиционно выявляемые в рубце КРС в значительных количествах [1; 2; 5].

В процессе онтогенеза у животных наблюдались значимые изменения представленности микроорганизмов. Содержание целлюлозолитических бактерий класса Clostridia и кислот-утилизирующих видов класса Negativicutes снижалось с возрастом, а бактерий с амило- и целлюлозолитическими свойствами филума Bacteroidetes, напротив, увеличивалось.

Выявлен широкий спектр микроорганизмов, традиционно относящихся к возбудителям различных заболеваний животных и человека: бактерии семейств Campylobacteraceae, Burkholderiaceae, филума Fusobacteria, рода Staphylococcus. С возрастом отмечена тенденция к увеличению их представленности [3; 4]. Наибольшая доля условно-патогенных микроорганизмов, включая актиномицеты филума Actinobacteria и семейства Enterobacteriaceae, выявлялась у молодняка.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда для реализации научно-проекта №17-76-20026 «Микробиоценоз рубца Rangifer tarandus Арктических регионов России как фундаментальная основа получения перспективных биотехнологий для сельскохозяйственных животных».

#### Литература:

1. Hungate R. E. *The Rumen and its Microbes*. New York: Academic Press, 1966.
2. Church D. C. *Ruminant Animal: Digestive physiology and nutrition*. New Jersey: Prentice Hall, 1993.
3. Лаптев Г. Ю. [и др.] *Нормы содержания микрофлоры в рубце крупного рогатого скота. Методические рекомендации*. С-Пб: БИОТРОФ, 2016. 48 с.
4. Самандас А. М., Лайшев К. А., Самойлов С. Г. Современная эпизоотическая ситуация по некробактериозу северных оленей на Таймыре // *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2011. № 5-6. С. 92-96.
5. Тараканов Б. В., Николичева Т. А. Целлюлозолитическая микрофлора и метаболические функции в рубце молодняка крупного рогатого скота при раннем включении в рацион растительных кормов // *Сельскохозяйственная биология*. 1986. №4. С. 89-94.

UDC 576.64

## AGE DIFFERENCES OF REINDEER RUMEN BACTERIAL COMPOSITION IN RUSSIAN ARCTIC

L.A. Ilina, G.Yu. Laptev, E.A. Yildirim, VA Filippova, T.P. Dunnyashev, A.V. Dubrowin, K.A. Laishev

Limited Liability Company «BIOTROF+», 8A Malinovskaya st., Off 7-H, Pushkin, St. Petersburg, 196602, Russia.  
e-mail: ilina@biotrof.ru

For the first time, the results of a comparative analysis of rumen bacterial community composition of calves, young and adult individuals of reindeer Rangifer tarandus of the Russian Arctic are presented.

**Key words:** reindeer, Rangifer tarandus, rumen microbiome, bacterial community, molecular genetic methods, T-RFLP analysis.

An important role in Rangifer tarandus life is played by microorganisms-symbionts of the rumen, which enable animals to effectively use the scarce nutrient resources of the tundra and forest-tundra [1]. However, the microbial community of the reindeer rumen, as well as its age-related changes, are the least observed comparing to other ruminants.

In this research, a comparative analysis of rumen bacterial community composition of calf (4 months), young (1-2 years) and adult individuals (3-6 years) Rangifer tarandus, inhabiting the Yamalo-Nenets Autonomous District, was conducted for the first time. The observe was performed in the laboratory of the company «BIOTROF +» using the T-RFLP method (Terminal restriction fragment length polymorphism) [3].

As a result of the research it was established that the majority of the phylotypes belonged to the Phylum Firmicutes, to a lesser extent - Bacteroidetes, Actinobacteria and Proteobacteria, in minor amounts - Tenericutes and Fusobacteria, Acidobacteria, Cyanobacteria. The cellulolytic bacteria of the family Ruminococcaceae, traditionally detected in significant amounts in rumen of cow, were almost completely absent [1; 2; 5].

In the ontogenesis process, significant changes in the representation of microorganisms were observed in animals. The content of cellulolytic bacteria of the Clostridia class and the acid-utilizing species of the Negativicutes class decreased with age, and the bacteria with the amylolytic and cellulolytic properties of the phylum Bacteroidetes,

on the contrary, increased.

Reindeer revealed a wide range of microorganisms traditionally belonging to the causative agents of various animal and human diseases, including the bacteria of the families Campylobacteraceae, Burkholderiaceae, Phylum Fusobacteria, and the genus Staphylococcus. With age, there was a tendency to increase their representation [3; 4]. The greatest proportion of opportunistic microorganisms, including actinomycetes of phylum Actinobacteria and the family Enterobacteriaceae, was detected in young animals.

The research was carried out with the support of Russian Science Foundation grant for the scientific project implementation No. 17-76-20026 «The Rangifer tarandus rumen microbiocenosis in Arctic regions of Russia as a fundamental basis for obtaining promising biotechnologies for farm animals.»

References:

1. Hungate R. E. *The Rumen and its Microbes*. New York: Academic Press, 1966.
2. Church D. C. *Ruminant Animal: Digestive physiology and nutrition*. New Jersey: Prentice Hall, 1993.
3. Laptev G. Yu. [et al.] *Standarts of rumen microflora in cattle. Metodicheskie rekomendacii*. S-Pb: BIOTROF, 2016. 48 S.
4. Samandas A.M., Lajshev K.A., Samojlov S.G. *Sovremennaja jepizooticheskaia situacija po nekrobakteriozu severnyh olenej na Tajmyre // Sibirskij vestnik sel'skhozjajstvennoj nauki*. 2011, № 5-6. S. 92-96.
5. Tarakanov B. V., Nikolicheva T. A. *Celljulozoliticheskaia mikroflora i metabolicheskie funkcii v rubce molodnjaka krupnogo rogatogo skota pri rannem vključenii v racion rastitel'nyh kormov // Sel'skhozjajstvennaja biologija*. 1986. №4. S. 89-94.

УДК 579.253.2

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (PISUM SATIVUM L.)

Сулима А.С., Жуков В.А., Афонин А.М., Тихонович И.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д. 3  
e-mail: ASulima@arriam.ru

Изучены механизмы, позволяющие азотфиксирующим бактериям преодолевать дефекты рецепции сигналов и морфогенеза симбиотических клубеньков со стороны растения. Данные можно использовать для проектирования искусственных систем узнавания симбионтов и повышения эффективности микробных препаратов.

**Ключевые слова:** бобовые растения; горох посевной; клубеньковый симбиоз; штамм-специфичность; симбиотические мутанты.

Большинство представителей семейства Бобовые (Fabaceae) вступают в симбиоз с почвенными азотфиксирующими бактериями (ризобиями), образуя на корнях особые органы – симбиотические клубеньки. Развитие клубенька происходит в несколько стадий и контролируется комплексной системой растительных генов. При этом одной из главных задач растения является выбор наиболее эффективного симбионта из всего пула почвенной микробиоты. Специфичность азотфиксирующего симбиоза достигается путём молекулярного диалога партнёров по принципу «ген на ген», т.е. обмена комплементарными сигналами и последовательного запуска физиологических ответов [5]. Таким способом растения ограничивают круг возможных симбионтов, взаимодействуя лишь с наиболее «подходящими» ризобиями.

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является одной из древнейших сельскохозяйственных культур [1], а также уникальным объектом для изучения специфичности бобово-ризобияльного симбиоза. В ходе анализа природных популяций культурного и дикорастущего гороха были идентифицированы генотипы, обладающие повышенной избирательностью к микросимбионту. Речь идёт о так называемых «афганских» формах гороха из Передней Азии, способных взаимодействовать лишь с отдельными штаммами *Rhizobium leguminosarum* [7]. Было показано, что данный признак контролируется растительным геном *Sym2*, продукт которого вовлечён в рецепцию главной симбиотической сигнальной молекулы бактерий – Nod-фактора [2, 3]. В дальнейшем в ходе экспериментального мутагенеза были получены линии гороха, неспособные к клубенькообразованию и/или азотфиксации, фенотип которых мог быть супрессирован воздействием определенных штаммов ризобий [8].

Согласно имеющимся данным, при помощи бактерий возможно супрессировать две группы мутаций:

i) мутации, влияющие на способность растения распознавать сигналы бактерий на ранних этапах (например, у линий RisNod4 и K24 – мутантов по гену Sym37, проявляющих фенотип, сходный с «афганским» [8]), и ii) мутации, приводящие к нарушению обмена метаболитами и/или сигнальными молекулами в уже сформированном клубеньке (например, у мутантных линий P61 (sym25) и P63 (sym26) [6]). Вероятно, штаммы ризобий, супрессирующие фенотипы упомянутых линий гороха, несут уникальные гены, которые позволяют им образовывать симбиоз «в обход» канонических сигнальных путей [4]. Хотя подобные свойства потенциально могут приводить к появлению паразитических штаммов, эффективно проникающих в растение, но не способных к фиксации азота, они также имеют важное прикладное значение. Расшифровка механизмов преодоления бактериями дефектов рецепции и морфогенеза клубеньков со стороны растения может послужить основой для проектирования искусственных систем узнавания симбионтов по типу «ключ-замок». Такие системы можно использовать для повышения эффективности микробных препаратов, поскольку растение будет образовывать симбиоз не с аборигенной почвенной микрофлорой, а исключительно с привнесённым штаммом, обладающим требуемыми свойствами.

Работа В.А. Жукова и А.М. Афонина была поддержана РФФ (грант 16-16-00118), работа А.С. Сулимы и И.А. Тихоновича была поддержана РФФ (грант 17-76-30016).

#### Литература:

1. Elzebroek A.T.G. *Guide to Cultivated Plants*. CABI / A. T. G. Elzebroek, K. Wind // Wallingford, UK – 2008.
2. Kozik A. *The pea early nodulin gene PsENOD7 maps in the region of linkage group I containing sym2 and leghaemoglobin* / A. Kozik, M. Matvienko, B. Scheres, V. G. Paruvangada, T. Bisseling, A. van Kammen, T. H. N. Ellis, T. LaRue, N. Weeden // *Plant Mol. Biol.* – 1996. – Т. 31 – № 1 – 149–156с.
3. Lie T.A. *Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions* / T. A. Lie // *Plant Soil* – 1971. – Т. 35 – № 1 – 117–127с.
4. Okazaki S. *Rhizobium–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the T3SS* / S. Okazaki, P. Tittabutr, A. Teulet, J. Thouin, J. Fardoux, C. Chaintreuil, D. Gully, J.-F. Arrighi, N. Furuta, H. Miwa // *ISME J.* – 2016. – Т. 10 – № 1 – 64–74с.
5. Provorov N.A. *Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza* / N. A. Provorov, A. Y. Borisov, I. A. Tikhonovich // *J. Theor. Biol.* – 2002. – Т. 214 – № 2 – 215–232с.
6. Sagan M. *Plant symbiotic mutants as a tool to analyse nitrogen nutrition and yield relationship in field-growth peas (Pisum sativum L.)* / M. Sagan, B. Ney, G. Duc // *Plant Soil* – 1993. – Т. 153 – № 1 – 33–45с.
7. Young J.P.W. *A distinct class of peas (Pisum sativum L.) from Afghanistan that show strain specificity for symbiotic Rhizobium* / J. P. W. Young, P. Matthews // *Heredity (Edinb.)*. – 1982. – Т. 48 – 203–210с.
8. Zhukov V. *The Pea Sym37 Receptor Kinase Gene Controls Infection-Thread Initiation and Nodule Development* / V. Zhukov, S. Radutoiu, L. H. Madsen, T. Rychagova, E. Ovchinnikova, A. Borisov, I. Tikhonovich, J. Stougaard // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2008. – Т. 21 – № 12 – 1600–1608с.

UDC 579.253.2

## GENETIC BASIS FOR CONSTRUCTION OF HIGH-SPECIFIC SYMBIOTIC SYSTEMS OF GARDEN PEA (PISUM SATIVUM L.)

Sulima A.S., Zhukov V.A., Afonin A.M., Tikhonovich I.A.

FSBSI "All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Microbiology"  
St. Petersburg, sh. Podbelskogo, d. 3. Russia 196608  
e-mail: ASulima@arriam.ru

Mechanisms that allow nitrogen-fixing bacteria to overcome the defects in the reception of signals and the morphogenesis of symbiotic nodules from the plant side are studied. Data can be used to design artificial systems for recognizing symbionts and improving the effectiveness of microbial drugs.

**Key words:** legumes; garden pea; nodule symbiosis; strain-specificity; symbiotic mutants.

The majority of representatives of the family Fabaceae (legumes) can participate in symbiosis with soil nitrogen-fixing bacteria (rhizobia) forming special organs called symbiotic nodules on the roots. Development of the nodule occurs in several stages and is controlled by a complex system of plant genes. For plant, one of the primary aims is to select the most effective symbiont from the entire pool of soil microbiota. The specificity of nitrogen-fixing symbiosis is achieved through a molecular dialogue of partners based on "gene-to-gene" principle, i.e. the exchange of complementary signals and the sequential trigger of physiological responses [5]. Thus, plants limit the range of possible symbionts, interacting only with the most «suitable» rhizobia.

Garden pea (*Pisum sativum* L.) is one of the most ancient crops [1], as well as a unique object for studying the specificity of legume-rhizobial symbiosis. During the analysis of natural populations of cultivated and wild pea, genotypes with increased selectivity to microsymbiont were identified. They are the so-called «Afghan» forms of pea from the Middle East able to interact only with particular strains of *Rhizobium leguminosarum* [7]. It was shown that this trait is controlled by the plant gene *Sym2*, the product of which is involved in the reception of the main symbiotic signaling molecule of bacteria – the Nod factor [2, 3]. In the course of experimental mutagenesis, pea lines that were incapable of nodule formation and/or nitrogen fixation were obtained, the phenotype of which could be suppressed by exposure to certain rhizobium strains [8].

According to available data, two groups of mutations can be suppressed with the help of bacteria: i) mutations affecting the ability of the plant to recognize bacterial signals at the early stages (for example, in the lines of *RisNod4* and *K24* with the mutation in the *Sym37* gene exhibiting a phenotype similar to «Afghan» one [8]), and ii) mutations leading to a disruption in the exchange of metabolites and/or signaling molecules in an already formed nodule (for example, mutant lines *P61* (*sym25*) and *P63* (*sym26*) [6]). The rhizobia strains that suppress the phenotypes of the aforementioned pea lines probably carry unique genes that allow them to form a symbiosis «bypassing» the canonical signaling pathways [4]. Although these properties can potentially lead to the appearance of parasitic strains that effectively inoculate the plant but are not capable of fixing nitrogen, they also have practical importance. Deciphering the mechanisms that allow bacteria to overcome the defects in the reception and morphogenesis of nodules in plant can serve as a basis for the design of artificial «key-lock» recognition systems for symbionts. Such systems can be used to increase the effectiveness of microbial preparations, since the plant will form a symbiosis not with an indigenous soil microflora, but exclusively with an introduced strain possessing the required properties.

The work of V.A. Zhukov and A.M. Afonin was supported by the Russian Science Foundation (grant # 16-16-00118), the work of A.S. Sulima and I.A. Tikhonovich was supported by the Russian Science Foundation (grant # 17-76-30016)

#### References:

1. Elzebroek A.T.G. *Guide to Cultivated Plants*. CABI / A. T. G. Elzebroek, K. Wind // Wallingford, UK – 2008.
2. Kozik A. The pea early nodulin gene *PsENOD7* maps in the region of linkage group I containing *sym2* and *leghaemoglobin* / A. Kozik, M. Matvienko, B. Scheres, V. G. Paruvangada, T. Bisseling, A. van Kammen, T. H. N. Ellis, T. LaRue, N. Weeden // *Plant Mol. Biol.* – 1996. – T. 31 – № 1 – 149–156c.
3. Lie T.A. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions / T. A. Lie // *Plant Soil* – 1971. – T. 35 – № 1 – 117–127c.
4. Okazaki S. Rhizobium–legume symbiosis in the absence of Nod factors: two possible scenarios with or without the *T3SS* / S. Okazaki, P. Tittabutr, A. Teulet, J. Thouin, J. Fardoux, C. Chaintreuil, D. Gully, J.-F. Arrighi, N. Furuta, H. Miwa // *ISME J.* – 2016. – T. 10 – № 1 – 64–74c.
5. Provorov N.A. Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza / N. A. Provorov, A. Y. Borisov, I. A. Tikhonovich // *J. Theor. Biol.* – 2002. – T. 214 – № 2 – 215–232c.
6. Sagan M. Plant symbiotic mutants as a tool to analyse nitrogen nutrition and yield relationship in field-growth peas (*Pisum sativum* L.) / M. Sagan, B. Ney, G. Duc // *Plant Soil* – 1993. – T. 153 – № 1 – 33–45c.
7. Young J.P.W. A distinct class of peas (*Pisum sativum* L.) from Afghanistan that show strain specificity for symbiotic *Rhizobium* / J. P. W. Young, P. Matthews // *Heredity* (Edinb). – 1982. – T. 48 – 203–210c.
8. Zhukov V. The Pea *Sym37* Receptor Kinase Gene Controls Infection-Thread Initiation and Nodule Development / V. Zhukov, S. Radutoiu, L. H. Madsen, T. Rychagova, E. Ovchinnikova, A. Borisov, I. Tikhonovich, J. Stougaard // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 2008. – T. 21 – № 12 – 1600–1608c.

УДК 577.21:577.218:575.113:633.358

## ГЕНОМИКА И ТРАНСКРИПТОМИКА СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ, ОБРАЗУЕМЫХ ГОРОХОМ ПОСЕВНЫМ (*PISUM SATIVUM* L.)

Жуков В.А.<sup>1</sup>, Афонин А.М.<sup>1</sup>, Жернаков А.И.<sup>1</sup>, Кулаева О.А.<sup>1</sup>, Сулима А.С.<sup>1</sup>, Тихонович И.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург, Россия  
196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д. 3.  
E-mail: vzhukov@ARRIAM.ru

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия  
199034. Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9.

Методы анализа геномов и транскриптомов при помощи секвенирования следующего поколения адаптированы к использованию для изучения симбиотических систем, образуемых горохом посевным.

**Ключевые слова:** геномика, транскриптомика, горох посевной, симбиотические системы.

Понимание генетических основ функционирования надорганизменных симбиотических систем, образуемых бобовыми растениями с полезными почвенными микроорганизмами, является необходимой основой менеджмента «адаптивного» земледелия. Построение моделей функционирования генетической системы бобовых растений необходимо для ее дальнейшего направленного улучшения. Выявляемые ценные аллели симбиотических генов могут быть использованы при создании новых сортов бобовых, например, путем «маркер-ассоциированной селекции».

Применение современных методов генетики, геномики и транскриптомики для изучения макро- и микросимбионтов позволяет выявлять закономерности функционирования надорганизменных растительно-микробных систем. Разработанные методы анализа, однако, чаще всего адаптированы для модельных объектов, геном которых расшифрован, и их использование в отношении «немодельных» объектов, имеющих большую значимость для сельского хозяйства, требует существенной доработки существующих алгоритмов работы и создания новых. Одним из представителей «немодельных» бобовых растений является горох посевной (*Pisum sativum* L.), используемый в качестве ценной сельскохозяйственной культуры во многих странах мира, включая Российскую Федерацию. К настоящему моменту с использованием анализа транскриптомов гороха посевного проведен ряд исследований, касающихся дифференциальной экспрессии генов, картирования генов и локусов количественных признаков, анализа внутривидового полиморфизма и пр. В докладе будут освещены результаты изучения экспрессии генов как гороха, так и клубеньковых бактерий, в симбиотических органах гороха посевного при помощи РНК-секвенирования.

В течение последних пяти лет с использованием технологий секвенирования следующего поколения было разработано и нанесено на генетическую карту большое количество молекулярных маркеров гороха. Авторами была создана база данных PMD (Pea Marker Database, [www.peamarker.arriam.ru](http://www.peamarker.arriam.ru)), содержащая информацию о 15944 маркерах, в том числе о локализации маркеров в группах сцепления, последовательности транскриптов, а также информация о гомологичных последовательностях *M. truncatula*, профилям экспрессии соответствующих транскриптов, представленных в экспрессионных атласах *M. truncatula* и *P. sativum* [1]. В отсутствие секвенированного генома гороха база PMD является самым полным «инструментом», объединяющим данные о последовательностях генов гороха, их экспрессии и локализации в геноме.

Развитие геномики и транскриптомики надорганизменных систем, образуемых горохом посевным, будет служить созданию новых технологий, направленных на стабилизации роста и развития растений в многокомпонентных растительно-микробных системах.

Работа В.А. Жукова и А.М. Афонина была поддержана РФФ (грант 16-16-00118), работа А.И. Жернакова, А.С. Сулимы и И.А. Тихоновича была поддержана РФФ (грант 17-76-30016), работа О.А. Кулаевой была поддержана РФФИ (грант 16-34-60132\_мол\_а\_дк).

#### Литература:

1. Kulaeva O. A., Zhernakov A. I., Afonin A. M., Boikov S. S., Sulima A. S., Tikhonovich I. A., Zhukov V. A. Pea Marker Database (PMD) - A new online database combining known pea (*Pisum sativum* L.) gene-based markers // *PLoS One*. 2017. Vol. 12. № 10. P. e0186713. doi: 10.1371/journal.pone.0186713.

UDC 577.21:577.218:575.113:633.358

GENOMICS AND TRANSCRIPTOMICS OF GARDEN PEA (*PISUM SATIVUM* L.) SYMBIOTIC SYSTEMS

Zhukov V.A.1, Afonin A.M.1, Zhernakov A.I.1, Kulaeva O.A.1, Sulima A.S.1, Tikhonovich I.A. 1,2

1 FSBSI ARRIAM, St.Petersburg, Russia

196608, St.Petersburg, Podbelsky ch. 3.

E-mail: [vzhukov@ARRIAM.ru](mailto:vzhukov@ARRIAM.ru)

2 Saint-Petersburg State University, St.Petersburg, Russia

199034. St.Petersburg, Universitetskaya emb. 7-9.

UDC 577.21:577.218:575.113:633.358

## GENOMICS AND TRANSCRIPTOMICS OF GARDEN PEA (*PISUM SATIVUM* L.) SYMBIOTIC SYSTEMS

Zhukov V.A.<sup>1</sup>, Afonin A.M.<sup>1</sup>, Zhernakov A.I.<sup>1</sup>, Kulaeva O.A.<sup>1</sup>, Sulima A.S.<sup>1</sup>, Tikhonovich I.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> FSBSI ARRIAM, St.Petersburg, Russia  
196608, St.Petersburg, Podbelsky ch. 3.  
E-mail: vzhukov@ARRIAM.ru

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State University, St.Petersburg, Russia  
199034. St.Petersburg, Universitetskaya emb. 7-9.

Methods of analysis of genomes and transcriptomes by next generation sequencing are adapted for use to study the symbiotic systems formed by garden pea.

**Key words:** genomics, transcriptomics, garden pea, symbiotic systems.

Understanding the genetic basis for the functioning of superorganismal symbiotic systems formed by leguminous plants with beneficial soil microorganisms is a necessary basis for managing of sustainable agriculture practices. The construction of models for the functioning of the genetic system of leguminous plants is necessary for its further directed improvement. Identified valuable alleles of symbiotic genes can be used to create new varieties of legumes, for example, by «marker-assisted selection».

The application of modern methods of genetics, genomics and transcriptomics to study of macro- and microsymbionts makes it possible to reveal the patterns of the functioning of superorganismal plant-microbial systems. The developed methods of analysis, however, are most often adapted for model objects whose genomes are decoded, and their use with respect to «non-model» objects, which are of great importance for agriculture, requires substantial refinement of existing work algorithms and the creation of new ones. One of the representatives of «non-model» leguminous plants is garden pea (*Pisum sativum* L.), used as a valuable agricultural crop in many countries of the world, including Russian Federation. To date, using the analysis of pea transcriptomes, a number of studies have been carried out concerning the differential expression of genes, mapping of genes and quantitative trait loci, analysis of intraspecies polymorphism, etc. In the presentation, the results of studying the expression of genes for both pea and nodule bacteria in symbiotic organs of pea using RNA sequencing, will be highlighted.

Over the past five years, using the next generation sequencing technology, a large number of molecular pea markers have been developed and genetically mapped. The authors created the PMD database (Pea Marker Database, [www.peamarker.ariam.ru](http://www.peamarker.ariam.ru)) containing information about 15944 markers, including the localization of markers in linkage groups, the sequence of transcripts, as well as information on homologous sequences of *M. truncatula* and expression profiles of the corresponding transcripts represented in *M. truncatula* and *P. sativum* gene expression atlases [1]. In the absence of a sequenced pea genome, the PMD database is the most complete «tool» combining data on the sequences of pea genes, their expression and localization in the genome.

The development of genomics and transcriptomics of superorganismal systems formed by pea will serve as a basis for creation of new technologies aimed at stabilizing the growth and development of plants in multi-component plant-microbial systems.

The work of V.A. Zhukov and A.M. Afonin was supported by the Russian Science Foundation (grant # 16-16-00118), the work of A.I. Zhernakov, A.S. Sulima and I.A. Tikhonovich was supported by the Russian Science Foundation (grant # 17-76-30016), the work of O.A. Kulaeva was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant # 16-34-60132\_mol\_a\_dk).

### References:

1. Kulaeva O. A., Zhernakov A. I., Afonin A. M., Boikov S. S., Sulima A. S., Tikhonovich I. A., Zhukov V. A. Pea Marker Database (PMD) - A new online database combining known pea (*Pisum sativum* L.) gene-based markers // *PLoS One*. 2017. Vol. 12. № 10. P. e0186713. doi: 10.1371/journal.pone.0186713.

УДК 577.113.5 / УДК 579.253.2

## ГЕНЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ПАТОГЕНА И ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЯ КАК ФАКТОРЫ КОЛОНИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ФИТОФТОРОЗА PHYTOPHTHORA INFESTANS

Мартынов В.В.<sup>1</sup>, Соколова Е.А.<sup>1</sup>, Чижик В.К.<sup>1</sup>, Кузнецова М.А.<sup>2</sup>, Рогозина Е.В.<sup>3</sup>, Хавкин Э.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБГНУ Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия  
127550, Москва, Тимирязевская ул., 42; e-mail: martynov.vik@gmail.com

<sup>2</sup> ФБГНУ Всероссийский институт фитопатологии, Большие Вяземы, Московская обл.;

<sup>3</sup> ФБГНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), С. Петербург

**Ключевые слова:** Phytophthora infestans, Solanum, устойчивость картофеля к фитофторозу, факторы вирулентности, Avr гены, Rpi гены, SSR (simple sequence repeats) генотипирование, SSCP (single-strand conformation polymorphism) анализ

Колонизацию растений картофеля возбудителем фитофтороза оомицетом *P. infestans* и биотрофную фазу развития этого патогена удобно рассматривать в рамках парадигмы trade off – компромисса, обеспечивающего успешное размножение патогена при том, что растение, пусть с существенными потерями, но заканчивает жизненный цикл. На молекулярном уровне хорошо изучен один из механизмов такого компромисса: взаимодействие продуктов генов (а) вирулентности *P. infestans* (Avr генов) - RXLR эффекторов - с продуктами расоспецифичных генов устойчивости растений к *P. infestans* (Rpi генов) – NB-LRR рецепторными киназами растений *Solanum*. Распознавание эффектора соответствующей киназой запускает реакцию сверхчувствительности и приводит к угнетению или поражению патогена; если эффектор не распознается, растение повреждается. Изоляты *P. infestans* были выделены в 2015 г. в питомнике ВИР (Пушкин, С. Петербург) из листьев межвидовых гибридов картофеля, различающихся по составу Rpi генов. Поскольку одно и то же растение могло быть колонизовано несколькими генотипами патогена, исследования проводили с монозооспоровыми линиями, выделенными из этих изолятов. По результатам SSR анализа исследованные линии делятся на два больших кластера, которые отчетливо различаются по составу факторов вирулентности, определяемых с помощью растений-дифференциаторов, соотношению аллелей Avr генов, идентифицируемых по их нуклеотидным последовательностям и SSCP профилям, и агрессивности в тесте с клубнями картофеля. Линии, собранные с одного растения, скорее, являются субклонами одного штамма *P. infestans*, хотя в нескольких случаях результаты генетического и фенотипического анализа указывают на совместную колонизацию одного растения различными штаммами *P. infestans*. Потенциальная вредоносность колонизирующих линий *P. infestans* (набор факторов вирулентности и аллельный состав Avr генов) и агрессивность этих линий сопоставлены с потенциальной устойчивостью колонизованных растений (состав Rpi генов) и фенотипической устойчивостью этих растений в поле в условиях естественного заражения или в тесте с отделенными листьями, зараженными высоковирулентным изолятом *P. infestans*. Работа выполнена в рамках Госзадания 0574-2014-0020.

UDC 577.113.5 / UDC 579.253.2

## PATHOGEN VIRULENCE GENES AND PLANT RESISTANCE GENES AS FACTORS OF POTATO PLANT COLONIZATION BY LATE BLIGHT INFECTION AGENT PHYTOPHTHORA INFESTANS

Martynov V.V.<sup>1</sup>, Sokolova E.A.<sup>1</sup>, Chizhik V.K.<sup>1</sup>, Kuznetsova M.A.<sup>2</sup>, Rogozina E.V.<sup>3</sup>, Khavkin E.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia  
127550 Moscow, 42 Timiryazevskaya ul.; e-mail: martynov.vik@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Phytopathology, Bol'shiye Vyazemy, Moscow region, Russia;

<sup>3</sup> N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

**Key words:** Phytophthora infestans, Solanum, potato late blight resistance, virulence factors, Avr genes, Rpi genes, SSR (simple sequence repeats) genotyping, SSCP (single-strand conformation polymorphism) analysis

Plant colonization by oomycete *P. infestans*, the causative agent of potato late blight, and the biotrophic phase of its development are convenient to explore within the paradigm of trade-off that ensures successful propagation



of the pathogen, while the plant, although at considerable loss, completes its life cycle. At the molecular level, one of the mechanisms of such a negotiation is well understood: the interaction of RXLR effectors, the products of the (a)virulence genes of *P. infestans* (Avr genes), - with NB-LRR receptor kinases of *Solanum* plants, the products of race-specific plant genes for resistance to *P. infestans* (Rpi genes). Effector recognition by matching kinases triggers a hypersensitive response, which leads to pathogen inhibition or defeat; when the particular effector is not recognized, the plant is damaged. Isolates of *P. infestans* were collected in 2015 in the nursery of VIR (Pushkin, St. Petersburg) from the leaves of interspecific potato hybrids with diverse profiles of Rpi genes. Since the same plant could be colonized by several pathogen genotypes, studies were conducted with monozygote lines obtained from these isolates. The SSR analysis separated the investigated lines into two large clusters that vividly differed in the composition of the virulence factors determined with the differential plants, in the patterns of the Avr alleles identified by their nucleotide sequences and the SSCP profiles, and in the aggressiveness in the potato tuber test. The lines harvested from one plant seemed to mostly represent subclones of a solitary *P. infestans* strain; however, in several cases, the results of genetic and phenotypic analysis presumed the solidary infestation of one plant by different strains of *P. infestans*. The potential pathogenicity of colonizing *P. infestans* lines as assessed by the profile of virulence factors, the allelic pattern of Avr genes and the aggressiveness were compared with the potential resistance of colonized plants as judged by the profile of Rpi genes and the phenotypic resistance of these plants in the field under natural infestation or in the laboratory test with detached leaves infected with a highly virulent *P. infestans* isolate. The study was supported by the State Task 0574-2014-0020.

УДК 577.152.31

## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ ESTUT1 БАКТЕРИИ *UREIBACILLUS THERMOSPHERAERICUS* И БИОКАТАЛИЗАТОРА НА ЕЕ ОСНОВЕ

Сорокина К.Н., Самойлова Ю.В., Пилигаев А.В., Пармон В.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, д.5  
 e-mail: sorokina@catalysis.ru

Проведено исследование свойств и эффективности экспрессии термостабильной эстеразы estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus* в присутствии молекулярных шаперонов. Показана высокая активность и стабильность поперечно сшитых агрегатов эстеразы в реакции гидролиза малатиона.

**Ключевые слова:** эстераза, термостабильность, гидролиз, биокатализатор.

Получение и изучение свойств новых термостабильных ферментов представляет значительный интерес для биотехнологии. В данной работе были изучены свойства термостабильной эстеразы estUT1 бактерии *U. thermosphaericus*, экспрессированной совместно с молекулярными шаперонами KJE, ClpB и ELS в составе вектора pET32b, в клетках *E. coli* BL21(DE3). Специфическая активность фермента с молекулярной массой 48 кДа после ко-экспрессии с шаперонами и очистки с помощью аффинной хроматографии увеличилась с  $22.6 \pm 1.7$  ЕА мг<sup>-1</sup> до  $200.7 \pm 15.5$  ЕА мг<sup>-1</sup>. Исследование свойств фермента показало, что эстераза estUT1 гидролизует преимущественно короткоцепочечные остатки жирных кислот (в том числе rNPC2 – rNPC8), обладает высокой стабильностью при температурах 50-70 °C и в диапазоне pH 5.0-9.0, имея оптимум температуры 70-80 °C и pH 8.0. Было установлено, что фермент estUT1 является первым охарактеризованным представителем нового XVIII семейства липолитических ферментов.

Полученный белок был использован для приготовления биокатализатора на основе поперечно сшитых агрегатов белка. Анализ свойств биокатализатора показал, что иммобилизация увеличила стабильность estUT1 при 50-80 °C и pH 5.0-10.0. Кроме того, биокатализатор оказался стабилен в присутствии различных веществ, в том числе: 10 мМ PMSF и DDT, 1% SDS и Tween 20. В модельной реакции гидролиза малатиона, широко применяющегося в качестве инсектицида, биокатализатор показал высокую активность при 37 °C: гидролиз малатиона на первом цикле составил  $99.5 \pm 1.4\%$ , на тринадцатом цикле -  $82.1 \pm 2.3\%$ . Таким образом, высокая активность и стабильность биокатализатора на основе эстеразы estUT1 позволит эффективно применять его в реакциях гидролиза сложноэфирных связей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-38-00386 мол\_а.

УДК 577.152.31

## STUDY OF THE PROPERTIES OF THE THERMOSTABLE ESTERASE ESTUT1 OF UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS AND THE BIOCATALYST PREPARED FROM IT

Sorokina K.N., Samoylova Yu.V., Piligaev A.V., Parmon V.N.

Boreskov institute of catalysis SB RAS  
630090, Novosibirsk, Akademika Lavrentieva Ave., 5  
e-mail: sorokina@catalysis.ru

In this study, we studied the properties and co-expression of the thermostable esterase estUT1 of *Ureibacillus thermosphaericus* with molecular chaperones. High activity and stability of cross-linked esterase aggregates were shown in the reaction of malathion hydrolysis.

**Key words:** esterase, thermal stability, hydrolysis, biocatalyst.

Isolation and study of the properties of new thermostable enzymes is of a significant interest for biotechnology. The properties of the thermostable esterase estUT1 of *U. thermosphaericus* was studied after its co-expression in the vector pET32b, were studied in *E. coli* BL21 (DE3) cells with the molecular chaperones team KJE, ClpB and ELS. The specific activity of the enzyme with a molecular weight of 48 kDa after co-expression with chaperones and purification by affinity chromatography increased from  $22.6 \pm 1.7$  U mg<sup>-1</sup> to  $200.7 \pm 15.5$  U mg<sup>-1</sup>. The study of the enzyme properties showed that esterase hydrolyzes predominantly short-chain fatty acid residues (including pNPC2-pNPC8), has high stability at temperatures of 50-70 °C and in the pH range of 5.0-9.0, with an optimum at 70-80 °C and pH 8.0. It was found that the enzyme estUT1 is the first characterized member of a new family (XVIII) of lipolytic enzymes.

Purified enzyme was used to prepare a biocatalyst from the cross-linked protein aggregates. Analysis of the properties of the biocatalyst showed that immobilization increased the stability of estUT1 at 50-80 °C and pH 5.0-10.0. In addition, the biocatalyst proved to be stable in the presence of various substances, including: 10 mM PMSF and DDT, 1% SDS and Tween 20. In the model reaction for the hydrolysis of malathion, which widely used as an insecticide, the biocatalyst showed high activity at 37 °C: hydrolysis malathion on the first cycle was  $99.5 \pm 1.4\%$ , on the thirteenth cycle -  $82.1 \pm 2.3\%$ . Thus, the high activity and stability of the biocatalyst based on estUT1 esterase allow to use for hydrolysis of esters.

The reported study was funded by RFBR according to the research project №18-38-00386 mol\_a.

УДК 579.25

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИ(2-ПИРИДИЛ-1-ОКСИД)ДИСЕЛЕНИДА НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ A. ORYZAE

Залепкина С. А., Смирнов В. Ф., Артемьева М. М.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И.Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия  
603950, Н.Новгород, проспект Гагарина, 23, e-mail: svetlanazalapkina@gmail.com

Исследовано влияние ди(2-пиридил-1-оксид)диселенида на уровень экспрессии генов A. oryzae. Показана активация генов оксидоредуктаз и ферментов, поддерживающих окислительно-восстановительный гомеостаз клеток, под действием ди(2-пиридил-1-оксид)диселенида.

**Ключевые слова:** микромицеты; селенсодержащие соединения; экспрессия генов.

Известно, что многие полимерные материалы способны подвергаться биодegradации микроорганизмами. Среди живых организмов наиболее активными биодegradантами являются микроскопические грибы, которые способны использовать в качестве источников питания малодоступные или совсем недоступные для других организмов субстраты. Процесс биодegradации носит ферментативный характер. В качестве средств защиты используются различные химические соединения. Показано, что различные селенсодержащие со-

единения при определенных концентрациях способны выступать в качестве регуляторов (активаторов или ингибиторов) метаболических путей микроорганизмов. В настоящее время механизм действия соединений селена, особенно органических, на микроскопические грибы очень мало изучен. В связи с этим представляет интерес выяснить, на какие метаболические пути микроскопических грибов способны оказывать влияние селеноорганические соединения. Определенный ответ на этот вопрос могут дать исследования по оценке уровня экспрессии генов микромицетов при действии на них химических соединений. В качестве объекта исследования нами был выбран гриб *A. oryzae* RIB-40, активный биодеградант промышленных и строительных материалов, а также химическое соединение ди(2-пиридил-1-оксид) диселенид, для которого ранее было установлено, что оно способно влиять на рост и активность ряда оксидоредуктаз данного микромицета. Для оценки влияния указанного соединения на уровень экспрессии генов нами использовалась общая РНК, выделенная из образцов мицелия *A. oryzae* RIB40 после 30 минутного воздействия 10 мг/л раствора ди(2-пиридил-1-оксид)диселенида в диметилсульфоксиде (ДМСО) или соответствующего количества ДМСО в контрольном эксперименте. Пробы ДНК для гибридизации были получены в ходе реакции обратной транскрипции с Су3- или Су5-мечеными рандомными наномерами. В общей сложности под влиянием данного соединения изменился уровень экспрессии 72 генов. Из них 16 генов показали снижение уровня экспрессии более чем в 2 раза, а 30 – активацию, также в 2 и более раз. Наиболее сильно была подавлена экспрессия гена AO090120000214, который кодирует белок-переносчик ионов меди. Гены, уровень экспрессии которых увеличился под действием данного соединения, кодируют разнообразные белки, в том числе шапероны, факторы инициации трансляции, гидролазы, редуктазы и т.д. Наибольшая активация была обнаружена для генов оксидоредуктаз и ферментов, поддерживающих окислительно-восстановительный гомеостаз, а именно НАДН:флавин оксидоредуктазы/12-оксофитодиеноатредуктазы, глутатион S-трансферазы, НАДН:флавиноксидоредуктазы, фосфоаденозин фосфосульфатредуктазы, НАД-зависимой оксидоредуктазы, тиоредоксинредуктазы, а также нитроредуктазы и НАДН:флавин оксидоредуктазы/12-оксофитодиеноатредуктазы. Для подтверждения данных, полученных методом микрочипового анализа ДНК, и уточнения значений разницы в экспрессии генов в мицелии после воздействия ди(2-пиридил-1-оксид)диселенида и контролем, выполнялась количественная ПРЦ в реальном времени. Данный метод подтвердил, что воздействие ди(2-пиридил-1-оксид)диселенида действительно вызывает значительную активацию генов оксидоредуктаз и глутатионтрансфераз, которые играют главную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза клеток. Из этого можно предположить, что одним из первых последствий проникновения селена в повышенных концентрациях в клетки *A. oryzae* является окислительный стресс, приводящий к нарушению окислительно-восстановительного гомеостаза. Возможно, это связано с процессами детоксикации селена внутри клеток, которые сопровождаются образованием АФК. Механизм ответственный за полногеномную активацию экспрессии генов оксидоредуктаз в ответ на воздействие селеносодержащих соединений остается не ясным. Одна из гипотез предполагает, что активация этих генов также связана с немедленным ответом на окислительный стресс, вызванный воздействием соединений селена.

UDK 579.25

## RESEARCH ON THE EFFECT OF BIS(2-PYRIDINE-N-OXIDE) DISELENIDE ON A. ORYZAE GENE EXPRESSION LEVEL

Zalepkina S.A., Smirnov V.F., Artemyeva M.M.

Federal State Autonomous Educational Institution for Higher Education "National Research University Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod", Nizhniy Novgorod, Russia  
 603950, Nizhniy Novgorod, Prospekt Gagarina, 23, e-mail: svetlanazalepkina@gmail.com

The effect of bis(2-pyridine-N-oxide) diselenide on *A. oryzae* gene expression level was studied. The activation of oxidoreductase and redox state regulating enzyme genes under bis(2-pyridine-N-oxide) diselenide action was shown.

**Key words:** fungi, selenium-containing compounds, gene expression.

It is well-known that many polymeric materials are subject to microbial destruction. Among living organisms fungi are the most active decomposers since they are able to use for food source substrates which are inaccessible or difficult to access for other organisms. The process of biodegradation has an enzymatic nature. Various chemical compounds are used as protectors. It has been shown that different selenium-containing compounds at certain concentrations are able to be regulators (activators or inhibitors) of microorganisms' metabolic pathways. Nowadays the mechanism of the action of selenium-containing compounds (especially organic ones) on fungi is

not properly understood. Therefore it is interesting to reveal what fungal metabolic pathways can be affected by organic selenium compounds. Research on the gene expression level of fungi exposed to the action of chemical compounds can provide some information concerning the issue. As the target of our research fungus *A. oryzae*, active decomposer of industrial and constructional materials, and bis(2-pyridine-N-oxide) diselenide were chosen. Previously it was established that given compound could have an effect on growth and activity of several oxidoreductases of *A. oryzae*. To estimate the influence of the given compound on gene expression level total RNA isolated from both *A. oryzae* RIB40 cells treated with 10 µg/l bis(2-pyridine-1-oxide)diselenide in dimethyl sulfoxide (DMSO) and cells treated with DMSO (in control experiment) for 30 min was used. DNA probes for hybridization were prepared by reverse transcription with either Cy3- or Cy5-labeled random nonamers. A total of 72 genes were identified as responsive, including the majority of genes from the oxidative stress response pathway: 16 genes showed a more than 2,0-fold decrease in expression upon diselenide treatment, while 30 showed a more than 2,0-fold increase. Utmost suppression was observed for gene AO090120000214, an encoding copper transporter. Genes whose expression level increased in response to bis(2-pyridine-N-oxide) diselenide treatment encode various proteins including chaperones, translation initiation factors, hydrolases, reductases, etc. The strongest upregulation was found for the genes of oxidoreductases and enzymes related to redox state, in particular NADH:flavin oxidoreductases/12-oxophytodienoate reductase, Glutathione S-transferase, NADH:flavin oxidoreductase, Phosphoadenosine phosphosulfate reductase, NAD-dependent oxidoreductase, Thioredoxin reductase and also nitroreductase and NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate reductase genes. To validate the differential expression of genes identified by microarray analysis, we performed quantitative PCR in real time. The method confirmed that bis(2-pyridine-N-oxide) diselenide treatment causes strong upregulation of oxidoreductase and glutathione transferase genes, which play a key role in maintaining redox homeostasis in cells. Therefore it is fair to assume that one of the first outcomes of the penetration of selenium at higher concentration in *A. oryzae* cells is oxidative stress resulting in redox homeostasis. Probably it is connected with selenium detoxication processes inside cells, which are accomplished by AOS production. Which mechanism is responsible for the global up-regulation of oxidoreductase genes in response to Se-containing compounds remains unclear. One possibility is that up-regulation of these genes can be immediate protective response to oxidative stress caused by selenium compounds.

УДК 579.64:632.937

## ОЦЕНКА РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЭНДОФИТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОФУНГИЦИДОВ

Каримова Л.З., Валидов Ш.З., Сафин Р.И.

Казанский государственный аграрный университет, Казань, Россия  
420015, Россия, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 65  
e-mail: radiksaf2@mail.ru

Проведен анализ эндофитов корней различных сельскохозяйственных культур, выбраны наиболее перспективные источники эндофитных бактерий для разработки биофунгицидов на их основе.

**Ключевые слова:** сельскохозяйственные растения, эндофитные бактерии, антагонистическая активность, биофунгициды

Биологическая защита от болезней является актуальным направлением в современном земледелии. Для создания новых биофунгицидов необходим подбор эффективных биологических агентов (biological control agents (BCAs)) [1]. К числу наиболее перспективных BCAs относятся эндофитные микроорганизмы растений [2]. Источниками эндофитных микроорганизмов могут быть различные сельскохозяйственные культуры и их части [3].

В качестве потенциальных источников эндофитных бактерий изучалась корневая система различных сельскохозяйственных культур – гороха (*Pisum sativum* L., сорт Тан), гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench, сорта – Медовая, Батыр), ярового двурядного ячменя (*Hordeum distichon* L., сорта – Раушан, Камашевский), морковь (*Daucus carota* subsp. *sativus*, сорт Витаминная). Растения выращивали в течение 14 дней в почвенной культуре. Почва отбиралась с участков после соответствующей сельскохозяйственной культуры. Выделение эндофитных бактерий проводили из стерильной корневой системы растений. Для культивирования эндофитов использовали среду Кинга Б. Оценка антагонистической активности выделенных эндофитных бактерий проводили в отношении фитопатогенного гриба *Fusarium oxysporum*.

Наибольшее количество эндофитных бактерий (320 шт.) было выделено из корневой системы гречихи сорта Медовая, а наименьшее количество (80 шт.) из корней моркови. Из корней ярового ячменя сорта Раушан было выделено на 25% больше эндофитных бактерий, чем у сорта Камашевский. Полученные изоляты проходили первичную оценку (морфологических свойств колоний, микроскопические признаки бактерий) и из каждой группы (источника) выделялось по 30 наиболее перспективных изолятов, которые в дальнейшем использовались для оценки антагонистической активности в отношении *Fusarium oxysporum*. Из 180 изучаемых изолятов, только 13 имели способность подавлять рост *Fusarium oxysporum*. Наибольшее число активных антагонистов (7 шт.) было выделено из моркови, несколько меньше (3 шт.) их гороха. Из корневой системы обоих сортов гречихи и ярового ячменя сорта Камашевский было получено по одному активному изоляту, а для сорта Раушан не было получено ни одного активного в отношении фитопатогенного гриба штамма. Максимальная зона подавления колонии *Fusarium oxysporum* отмечалась у изолятов KGAU-2017-199 (яровой ячмень сорт Камашевский), KGAU-2017-29 (морковь). Данные изоляты являются перспективными для создания новых биофунгицидов.

Работа проводилась в соответствии с Проектом «Разработка современных биологических систем защиты растений от биотических, абиотических и антропогенных стрессов, а также технологий их применения в адаптивном сельском хозяйстве» и финансируется Министерством образования и науки Российской Федерации. Уникальный код - RFMEFI61017X0017.

#### Литература.

1. Whipps, J. M. *Biological control agents in plant disease control*/ J. M. Whipps, M. McQuilken // *Disease Control in Crops: Biological and Environmentally Friendly Approaches*. Blackwell Publishing Ltd, 2009. P.27-61.
- Haggag, W. M. *Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases*/ Wafaa M. Haggag// *Life Science Journal*. 2010. Vol. 7(2). P. 57-62.
- Hallmann, J. *Bacterial endophytes in agricultural crops*/ Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, and J. W. Klopper // *Can. J. Microbiol.* 1997. Vol. 43. P.895– 914.

UDC 579.64:632.937

## THE EVALUATION OF VARIOUS SOURCES OF ENDOPHYTIC MICROORGANISMS FOR NEW BIOFUNGICIDES

Karimova L.Z., Validov S.Z., Safin R.I.

Kazan State Agricultural University, Kazan, Russia  
420015, Russia, Kazan, 65 K. Marx str.  
e-mail: radiksaf2@mail.ru

The analysis of root endophytes of various agricultural crops was carried out. The most promising sources of endophytic bacteria were selected for the development of biofungicides based on them.

**Key words:** agricultural plants, endophytic bacteria, antagonistic activity, biofungicides

Biological protection against diseases is an actual trend in modern agriculture. To create new biofungicides a set of effective biological agents (biological control agents (BCA)) is required [1]. Among promising BCAs are endophytic plant microorganisms [2]. Sources of endophytic microorganisms can be various crops and their parts [3].

The root system of various crops was investigated. The studied were pea (*Pisum sativum* L., var. Tan), buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench, var. Medovaia, Batyr), spring barley (*Hordeum distichon* L., var. Raushan, Kamashevsky), carrots (*Daucus carota* subsp. *sativus*, var. Vitaminaja). Plants were grown for 14 days. Soil was taken from the plots after the each crop. Isolation of endophytic bacteria was carried out from the sterile root system of plants. To cultivate the endophytes, King's B medium was used. Evaluation of the antagonistic activity of the isolated endophytic bacteria was carried out against the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum*.

The largest number of endophytic bacteria (320 isolates) was isolated from the root system of buckwheat var. Medovaia and the least amount (80 isolates) from the carrots roots. Out of the roots of spring barley var. Raushan, 25% more endophytic bacteria were isolated than for var. Kamashevsky. The isolates (30 isolates from each source) were subsequently used to evaluate antagonistic activity against *Fusarium oxysporum*. From the 180 isolates studied, only 13 isolates has the ability to suppress the growth of *Fusarium oxysporum*. The greatest number of active antagonists (7 isolates) was received from carrots and the from pea (3 isolates). From the root system of both varieties of buckwheat and spring barley of Kamashevsky variety by one active isolate was obtained.

From roots spring barley var. Raushan there was not found the active strains. The maximum zone of inhibition of the *Fusarium oxysporum* colony was noted in KGAU-2017-199 isolates (spring barley var. Kamashevsky) and KGAU-2017-29 (carrots). These isolates are promising for the creation of new biofungicides.

This work was carried out in accordance with the project «Development of modern biological plant protection systems against biotic, abiotic and anthropogenic stresses, as well as technologies for their application in adaptive agriculture» and is funded by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation. Unique code - RFMEFI61017X0017.

*References:*

1. Whipps, J. M. *Biological control agents in plant disease control*/ J. M. Whipps, M. McQuilken // *Disease Control in Crops: Biological and Environmentally Friendly Approaches*. Blackwell Publishing Ltd, 2009. P.27-61.

Haggag, W. M. *Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases*/ Wafaa M. Haggag// *Life Science Journal*. 2010. Vol. 7(2). P. 57-62.

Hallmann, J. *Bacterial endophytes in agricultural crops*/ Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, and J. W. Kloepper // *Can. J. Microbiol.* 1997. Vol. 43. P.895– 914.

УДК 582.962:547.918

## ПРИРОДНО-ТРАНСГЕННОЕ РАСТЕНИЕ *LINARIA VULGARIS*, КАК ИСТОЧНИК ИРИДОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Сокорниова С.В., Богомаз О.Д., Матвеева Т.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9  
e-mail: s.sokornova@spbu.ru

В растениях и каллусах *Linaria vulgaris* проанализированы вторичные метаболиты. Показано, что мажорными соединениями в целых растениях являются иридоидные гликозиды (антирринозид и его дериваты) и флавоноиды (ацетилпектолинин), а в каллусах преимущественно иридоиды. Эти биологически активные соединения выполняют в природе защитные функции. Растения, богатые иридоидными гликозидами, широко применяются в фолк-медицине. Кроме того, эти соединения могут найти свое применение, как экологически безопасные препараты в интегрированной системе биологической защиты растений.

**Ключевые слова:** иридоидные гликозиды; природно-трансгенное растение; каллусная ткань; *Linaria vulgaris*; фунгицидная, инсектицидная активность

Одна из гипотез о возможной функции клТ-ДНК у природно-трансгенных видов является ее влияние на синтез вторичных метаболитов, поэтому представляет интерес их всестороннее изучение. Одним из примеров природно-трансгенных растений являются некоторые виды льнянок, в частности, *L. vulgaris* [1]. Мажорными метаболитами этих растений являются иридоидные гликозиды (ИГ) – класс монотерпеновых соединений, участвующих в защите растений от насекомых вредителей и патогенов. Антирринозид является хемотаксономическим маркером растений трибы *Antirrhineae*, к которой относится *Linaria*. В природе он отпугивает неопыляющих насекомых, а также попадая с пищей в организм некоторых чешуекрылых и сосущих, может защищать их от врагов [2-4]. С присутствием другого соединения - антиррида связывают тот факт, что *L. vulgaris* характеризуется обедненной микобиотой и фактически не погибает в результате поражения фитопатогенами [5]. Антирринозид и его производные широко применяются в фолк-медицине [6]. Поэтому перспективной является отработка методов наиболее эффективного синтеза соединений в растениях, включая выбор генотипов, тканей, условий культивирования и т.п. Целью работы было сравнение спектра вторичных метаболитов в асептических растениях и каллусных тканях *L. vulgaris*. Экспланты междоузлий помещали на среду Мурасига и Скуга [7] с бензиламинопурином и нафтилуксусной кислотой (0.1 и 0.4 мг/л). Анализ метанольных экстрактов из растений и каллусов проводился с помощью тонкослойной хроматографии [8] и высокотемпературной газовой хромато-масс-спектрометрии [9], что позволило установить подвижность основных компонентов, а также особенности их окраски. Как в целых растениях, так и в каллусных тканях *L. vulgaris* преувалировал антирринозид. Также там выявлялись близкие по структуре ИГ. В экстрактах целых растений также определяются флавоноиды (ацетилпектолинин и др.). Необходимо отметить, что содержание ИГ в целых растениях может сильно колебаться в зависимо-

сти от внешних условий. В опыте содержание ИГ в целых растениях и каллусах было стабильно высоким, и достигал 5% по сухому весу. Таким образом, растения и каллусная ткань *L. vulgaris* могут служить сырьем для получения ИГ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 16-16-10010. Авторы благодарят РЦ СПб-ГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Литература:

1. Matveeva T.V., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants//*Front. Plant. Sci.* 2014. Vol.5. P.326.
2. Lohaus G., Schwerdtfeger M. Comparison of Sugars, Iridoid Glycosides and Amino Acids in Nectar and Phloem Sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica* //*PlosOne* 2014. DOI: [napus10.1371/journal.pone.0087689](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087689)
3. Comstock J.A. The early stages of *Oncocnemis perscripta* (Guenee)//*Bull. So. Calif. Acad. Sci.* 1958. Vol.57. P.81-84.
4. Сокоорнова С.В., Гасич Е.Л., Матвеева Т.В., Афонин А.Н. Микромицеты растений рода *Linaria*, содержащих в геноме т-ДНК // *Микология и фитопатология.* - 2015. - Т.49, №3. - С.188-193.
5. El-Naggar L.J., Beal J.L. Iridoids. An updated review Part I//*J. Nat. Prod.* 1980. Vol. 43: P. 649-707.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture//*Physiol. Plant.* 1962. Vol.15. P.165–170.
7. Nikolova-Damyanova B., Ilieva E., Handjieva N., Bankova V. Quantitative thin layer chromatography of iridoid and flavonoid glucosides in species of *Linaria*//*Phytochem. Anal.* 1994. Vol.5. P.38-40.
8. Kubincová J., Višňovský J., Rosenberg M., Hronská H., Chochulová A., Kubinec R., Blaško J. Analysis of glycosidic flavonoids and iridoids by gas chromatography//*J. Food Nutr. Res.* 2016. Vol.55. P.374–381.

UDC 582.962:547.918

## NATURALLY TRANSGENIC PLANT *LINARIA VULGARIS* AS A SOURCE OF IRIDOID GLYCOSIDES

Sokornova S.V., Bogomaz O.D., Matveeva T.V.

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia  
Universitetskaya emb,7/9, St. Petersburg, Russia, 199034  
e-mail: [s.sokornova@spbu.ru](mailto:s.sokornova@spbu.ru)

Secondary metabolites were analyzed in plants and callus culture of *Linaria vulgaris*. It was shown that iridoid glycosides (antirrhinoside and its derivatives) are major compounds in whole plants and calli. In addition to antirrhinoside and its derivatives, whole plants contain flavonoids (acetylpectolarin). In nature, these biologically active compounds may play certain protective role. Iridoid glycoside containing plants are widely used in folk medicine. In addition, these drugs can be used for developing environmentally friendly formulations intended for application in integrated crop protection.

**Key words:** iridoid glycosides; a naturally transgenic plant; callus tissue; *Linaria vulgaris*; fungicidal, insecticidal activity

It can be supposed that the naturally transgenic plants may have higher levels of secondary metabolites than non-transgenic one, so these species are of interest to study. Some species of toadflax, in particular *Linaria vulgaris*, are examples of the naturally transgenic plants [1]. Major metabolites of these plants are iridoid glucosides (IG) belonging to the class of secondary metabolites known as monoterpenoids. This biologically active substances may play significant role in the resistance of plants to phytopathogenes and pests. IG antirrhinoside is a chemotaxonomic marker of the plants of the tribe Antirrhineae including *L. vulgaris*. What is why we selected *L. vulgaris* for our studies. In nature, antirrhinoside was found in plant nectar, where it repels non-polluting insects from flowers [2]. In addition, some lepidopterans and suckers get iridoid glycosides with food, and these compounds can protect them from enemies [3]. The presence of antirrhidine in areal parts of plants can explain why the naturally transgenic species of *L. vulgaris* are characterized by low susceptibility to fatal pathogenic micromycetes [4]. Antirrhinoside and its derivatives are widely used in folk medicine [5]. That is why it could be very interesting to develop of more effective methods of increasing the levels of the secondary metabolites in plants, including the selection of genotypes, tissues and cultivation conditions. The aim of this study was to compare the pool of secondary metabolites in aseptically grown plants and calli of *L. vulgaris*. Interstitial explants were placed on Murasig and Skoog [6] medium with benzylaminopurine and naphthylacetic acid (0.1 and 0.4 mg / l). Analysis of methanol extracts from plants and calli was carried out using thin-layer chromatography [7] and high-temperature gas chromatography with mass

spectrometry detection [8]. It was allowed to establish the retardation factor (Rf) of major components, as well as their coloring with anisic anhydride. Antirrhinoside prevails in whole plants and calli. In addition, alcoholic extracts of toadflax contains the flavonoid acetylpectolinarin.

The level of iridoid glycosides in whole plants was stably high. The yield of iridoid glycosides in the calli was higher than the yield from plants (5% by dry weight). Thus, plants and callus tissue of *L. vulgaris* can serve as drugs of antirrhinoside and its derivatives.

This work was supported by RSF grant 16-16-10010. The authors acknowledge Centre for Molecular and Cell Technologies of Saint-Petersburg State University.

#### References:

1. Matveeva T.V., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plants//*Front. Plant. Sci.* 2014. Vol.5. P.326.
2. Lohaus G., Schwerdtfeger M. Comparison of Sugars, Iridoid Glycosides and Amino Acids in Nectar and Phloem Sap of *Maurandya barclayana*, *Lophospermum erubescens*, and *Brassica* //*PlosOne* 2014. DOI: [10.1371/journal.pone.0087689](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087689)
3. Comstock J.A. The early stages of *Oncocnemis perscripta* (Guenee)//*Bull. So. Calif. Acad. Sci.* 1958. Vol.57. P.81-84.
4. Sokornova S.V., Gasich E.L., Matveeva T.V., Afonin A.N. Micromycetes of plants *Linaria* containing DNA sequences of *Agrobacterium* origin in their genomes//*Mikologiya i Fitopatologiya*. 2015. Vol.49, №2. P.140-145 (in Russ.).
5. El-Naggar L.J., Beal J.L. Iridoids. An updated review Part I//*J. Nat. Prod.* 1980. Vol. 43: P. 649-707.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture//*Physiol. Plant.* 1962. Vol.15. P.165–170.
7. Nikolova-Damyanova B., Ilieva E., Handjieva N., Bankova V. Quantitative thin layer chromatography of iridoid and flavonoid glucosides in species of *Linaria*//*Phytochem. Anal.* 1994. Vol.5. P.38-40.
8. Kubincová J., Višňovský J., Rosenberg M., Hronská H., Chochulová A., Kubinec R., Blaško J. Analysis of glycosidic flavonoids and iridoids by gas chromatography//*J. Food Nutr. Res.* 2016. Vol.55. P.374–381.

УДК: 573.6.086.835

## ПРОФИЛЬ ЖИРНЫХ КИСЛОТ *PARIETOCHLORIS* SP. ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

**А.И.Голубева<sup>1</sup>, Г.Б.Бутаева<sup>1</sup>, М.Петрушкина<sup>2</sup>, Б.Сорокин<sup>2</sup>, А.Филимонова<sup>2</sup>, Н.Зотько<sup>2</sup>, З.Намсараев<sup>2</sup>, Д.Кузьмин<sup>2</sup>, Е.Гусев<sup>2</sup>, Е.Мальцев<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Московский Государственный Университет имени Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, [alexandrag16@gmail.com](mailto:alexandrag16@gmail.com), 89197767932

<sup>2</sup>ООО «Соликсонт», Россия, 119991, Москва, Ленинский проспект, 65, Ц-47-3, ,

<sup>3</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, Россия, 152742, Борок

Изучен новый штамм почвенных зелёных водорослей *Parietochloris* sp. Снижение концентрации нитрата и фосфата в среде приводило к увеличению содержания олеиновой кислоты с 7-11% до 45-46%.

**Ключевые слова:** Trebouxiophyceae, *Parietochloris* sp., профиль жирных кислот

*Parietochloris* Watanabe et Floyd один из мало изученных родов зелёных водорослей. Согласно современной концепции род принадлежит к Trebouxiophyceae, но не формирует монофилетической группы [1]. Trebouxiophyceae привлекают к себе внимание благодаря их потенциалу в биотехнологии. Род *Parietochloris* включает штаммы, известные как продуценты различных липидов [2]. Главной целью этой работы было исследовать биотехнологический потенциал одного из представителей данного рода.

В качестве объекта исследования был использован почвенный штамм CAMU MZ-Ch5. Культура была помещена в коллекцию BOROK WDCM602 в Институте биологии внутренних вод РАН им. Папанина. Для установления филогенетического положения штамма были секвенированы гены 18S рДНК и *rbcL*, благодаря чему мы установили, что данный штамм относится к роду *Parietochloris*. Так же была проведена серия экспериментов по оптимизации условий культивирования. В ходе первого эксперимента с различными концентрациями фосфата (0,22 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ) было выявлено, что максимальное содержание биомассы обнаруживается при выращивании на среде с концентрацией фосфата 0,5 мМ (1,9 ± 0,1 г/л). При этом в профиле жирных кислот (ЖК) доминируют линолевая кислота (24-25%), пальмитиновая кислота (12-14%), линоленовая кислота (9-12%), олеиновая кислота (7-11%). В ходе второго эксперимента была изучена зависимость состава ЖК от условий культивирования. Были проверены следующие условия: 5,7 мМ нитрата и 1 мМ фосфата; 0 мМ нитрата, 1 мМ фосфата; 17 мМ нитрата, 0 мМ фосфата; 0 мМ нитрата и фосфата; контроль – 17 мМ нитрата и 1 мМ фосфата. В результате выявлено, что содержание биомассы максимально (2,6±0,1 г/л)



при выращивании на среде с низким содержанием нитрата. В условиях нитратного и фосфатного голодания содержание олеиновой кислоты возросло до 45-46%. Максимальное содержание линоленовой кислоты наблюдалось в контрольном варианте (13%).

Таким образом, снижение в среде культивирования концентрации нитратов или нитратов и фосфатов приводило к значительному увеличению содержания ЖК в сравнении с контролем. Данный штамм можно считать потенциальным продуцентом линолевой кислоты. Высокое содержание олеиновой и линолевой кислот в профиле ЖК указывает на потенциал этого штамма для получения биодизеля.

Литература:

1. Neustupa, J., Eliáš, M., Škaloud, P., Němcová, Y., & Šejnohová, L. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga // *Phycologia*. – 2011. – Vol. 50. – №1. – P. 57-66. 2. Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. *Microalgae for biodiesel production and other applications: a review* // *Renewable and sustainable energy reviews*. – 2010. – Vol. 14. – № 1. – P. 217-232.

UDC 573.6.086.835

## FATTY ACID PROFILE OF PARIETOCHLORIS SP. UNDER DIFFERENT CULTURING CONDITIONS

**A. Golubeva<sup>1</sup>, G. Butaeva<sup>1</sup>, M. Petrushkina<sup>2</sup>, B. Sorokin<sup>2</sup>, A. Filimonova<sup>2</sup>, N. Zotko<sup>2</sup>, Z. Namsaraev<sup>2</sup>, D. Kuzmin<sup>2</sup>, E. Gusev<sup>2</sup>, Y. Maltsev<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1

<sup>2</sup> LLC «Solixant», Russia, 119991, Moscow, Leninsky prospect, 65, Ц-47-3

<sup>3</sup> I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters RAS, Russia, 152747, Borok

A new soil green algae strain *Parietochloris* sp. was studied. The reduction of concentration's nitrate and phosphate increased content oleic acid from 7-11% to 45-46%.

**Key words:** Trebouxiophyceae, *Parietochloris* sp., fatty acid profile

*Parietochloris* Watanabe et Floyd is one of the poorly studied genera of green algae. According to modern concepts, the genus belongs to the Trebouxiophyceae algae but does not form a monophyletic group [1]. Trebouxiophyceae attract attention because of their biotechnological potential. The genus *Parietochloris* includes strains known as producers of various lipids [2]. The main purpose of this work was to study biotechnological potential.

The object of the study was soil strain CAMU MZ–Ch5. The culture was deposited in the BOROK WDCM602 collection of the Papanin Institute for Biology of Inland Waters of the Russian Academy of Sciences. To evaluate the phylogenetic position of this strain, we sequenced fragments of 18S rDNA and chloroplast *rbcL* genes, whereby we established that this strain belongs to genus *Parietochloris*. In addition, series of experiments to identify optimal growth conditions were carried out. The first experiment with different phosphate concentration (0.22 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM) showed that highest biomass dry weight was determined on the medium with a phosphate concentration of 0.5 mM (1.9 ± 0.1 g/l). The dominant fatty acids in the profile were linoleic acid (24–25%), palmitic acid (12–14%), linolenic acid (9–12%), oleic acid (7–11%). In the second experiment, we analyzed the dependence of fatty acid profile from growth conditions. The following condition were examined: 5.7 mM nitrate and 1 mM phosphate; 0 mM nitrate, 1 mM phosphate; 17 mM nitrate, 0 mM phosphate; 0 mM nitrate and phosphate; control – 17 mM nitrate, 1 mM phosphate. The maximum biomass dry weight (2.6 ± 0.1 g/l) was obtained on the medium with low nitrate concentration. In the conditions nitrates and phosphate starvation, the percentage of oleic acid increased to 45–46%. The maximum percentage of linolenic acid was noted in the control (13%).

Thus, the lack of nitrates or nitrates and phosphates led to significant increase in the content of fatty acids. This strain can be considered as a potential producer of the essential linoleic acid. A high proportion of oleic and linoleic acids in the fatty acids profile indicates the potential of this species for the production of biodiesel.

References:

1. Neustupa, J., Eliáš, M., Škaloud, P., Němcová, Y., & Šejnohová, L. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga // *Phycologia*. – 2011. – Vol. 50. – №1. – P. 57-66. 2. Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. *Microalgae for biodiesel production and other applications: a review* // *Renewable and sustainable energy reviews*. – 2010. – Vol. 14. – № 1. – P. 217-232.

УДК 577.113.5

## СЕКВЕНИРОВАНИЕ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В ИЗУЧЕНИИ ПРИРОДНО-ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Матвеева Т.В., Хафизова Г.В., Добрынин П.В., Полев Д.Е., Лутова Л.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9  
e-mail: radishlet@gmail.com

В докладе рассмотрены примеры применения секвенирования нового поколения для поиска новых вариантов горизонтального переноса генов от агробактерий к растениям, изучения особенностей организации клТ-ДНК, исследования полиморфизма популяций по маркерам клТ-ДНК, характеристики растительно-микробных взаимодействий с участием трансгенных растений

**Ключевые слова:** природно-трансгенные растения, секвенирование нового поколения, *Linaria*, *Nicotiana*, *Ipomoea*

В природе описаны растения, в геномах которых присутствуют последовательности, гомологичные Т-ДНК агробактерий, полученные в результате генетической трансформации их предковых форм. Такая Т-ДНК называется клеточной (клТ-ДНК), а растения ее содержащие – природно-трансгенными. К настоящему времени природно-трансгенные виды описаны в пределах родов *Linaria*, *Nicotiana*, *Ipomoea* (Matveeva, Sokornova, 2017). Неоднократное возникновение в природе трансгенных форм наводит на мысль о некоторой пользе последовательностей, привнесенных в геном растений от агробактерий (Matveeva, Lutova, 2014). Для изучения эволюционной роли клТ-ДНК необходимы новые исследования, направленные на пополнение списка известных природно-трансгенных видов, описание структуры клТ-ДНК у обнаруженных видов, изучение ее полиморфизма, а также исследование ее эколого-генетических функций. Развитие методов анализа нуклеиновых кислот открывает новые перспективы изучения горизонтального переноса генов.

Постоянно пополняющийся список отсекуированных геномов позволяет проводить поиск Т-ДНК-подобных последовательностей биоинформатически, а также описывать структуру и разнообразие клТ-ДНК в геномах (Chen, Otten, 2017). Благодаря этой возможности был пополнен список вариантов клТ-ДНК.

Секвенирование нового поколения (NGS – next generation sequencing) позволяет использовать для изучения полиморфизмов заранее выбранных фрагментов клТ-ДНК методологию TILLING (Comai et al, 2004), не прибегая к помощи нуклеаз, что делает анализ более надежным. Данным методом были выявлены полиморфизмы клТ-ДНК льнянок, используемые нами в филогеографических исследованиях.

NGS позволяет изучать сообщества микроорганизмов ризосферы и филлосферы растений (Hugenholtz, 2002) для оценки влияния генов клТ-ДНК на таксономический состав бактерий, архей и грибов, окружающих растение.

В ходе доклада будут рассмотрены конкретные примеры использования NGS для поиска новых клТ-ДНК и изучения организации и функционирования клТ-ДНК у льнянок и табака.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, грант № 16-16-10010. Авторы благодарят РЦ СПб-ГУ «Биобанк» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

### Литература

1. Matveeva T. V., Sokornova S. V. *Biological Traits of Naturally Transgenic Plants and Their Evolutional Roles*// *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017. Vol. 64. P. 635–648.
2. Matveeva T.V., Lutova L.A. *Horizontal gene transfer from Agrobacterium to plants*//*Front. Plant. Sci*. 2014. Vol.5. P.326.
3. Chen K., Otten L. *Natural Agrobacterium Transformants: Recent Results and Some Theoretical Considerations*// *Front. Plant Sci.*, 13 September 2017 | <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01600>
4. Comai, L.; Young, K.; Till, B. J.; Reynolds, S. H.; Greene, E. A.; Codomo, C. A.; Enns, L. C.; Johnson, J. E.; Burtner, C.; Odden, A. R.; Henikoff, S. *Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling*// *The Plant Journal*. 2004. Vol. 37. P. 778–786.
5. Hugenholtz P. *Exploring prokaryotic diversity in the genomic era.* // *Genome biology*. 2002. Vol. 3. P. 0003.

UDC 577.113.5

## NEXT GENERATION SEQUENCING IN THE INVESTIGATION OF NATURALLY TRANSGENIC PLANTS

**Matveeva T.V., Khafizova G.V., Dobrynin P.V., Polev D.E., Lutova L.A.**

St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia  
Universitetskaya emb,7/9, St. Petersburg, Russia, 199034  
e-mail: radishlet@gmail.com

The report represents examples of the application of the next generation sequencing methods to search for new variants of horizontal gene transfer from agrobacteria to plants, study of the peculiarities of the organization of cT-DNA, investigation of polymorphism of cT-DNA markers in different populations of naturally transgenic plants, characteristics of plant-microbe interactions, involving transgenic plants.

**Key words:** naturally transgenic plants, next generation sequencing, *Linaria*, *Nicotiana*, *Ipomoea*

In natural conditions, there are plants containing sequences homologous to T-DNA of agrobacteria in their genomes, obtained as a result of genetic transformation of their ancestral forms. Such T-DNA is called cellular (cT-DNA), and plants, containing its, are called naturally-transgenic. To date, naturally transgenic species have been described within the genera *Linaria*, *Nicotiana*, *Ipomoea* (Matveeva, Sokornova, 2017). Multiple occurrence of such transgenic forms in nature suggests some benefits that plants obtained along with sequences from bacteria (Matveeva, Lutova, 2014). To study the evolutionary role of cT-DNA, new research is needed to replenish the list of known naturally transgenic species, to describe the structure of already found cT-DNA, to study its polymorphism, and to investigate its ecological and genetic functions. The development of methods for the analysis of nucleic acids opens up new prospects for studying the horizontal transfer of genes.

The ever-expanding list of sequenced genomes allows the search for T-DNA-like sequences bioinformatically, and to describe the structure and diversity of cT-DNA in genomes (Chen, Otten, 2017). Due to this opportunity, a list of variants of cT-DNA was replenished.

The next generation sequencing allows the TILLING methodology (Comai et al, 2004) to be used for the study of polymorphisms of previously selected cT-DNA fragments without resorting to nuclease help, which makes the analysis more reliable. This method revealed polymorphisms of toadflaxes cT-DNA, which we used in phylogeographic studies.

NGS allows the study of communities of microorganisms in the rhizosphere and phyllosphere of plants (Hugenholtz, 2002) to assess the effect of cT-DNA genes on the taxonomic composition of bacteria, archaea and fungi surrounding the plant.

The report will consider specific examples of the use of NGS to search for new cT-DNA and to study the organization and functioning of cT-DNA in toadflax and tobacco.

This work was supported by RSF grant 16-16-10010. The authors acknowledge Centre BioBank and Centre for Molecular and Cell Technologies of Saint-Petersburg State University.

### References:

1. Matveeva T. V. and Sokornova S. V. *Biological Traits of Naturally Transgenic Plants and Their Evolutional Roles// Russian Journal of Plant Physiology*, 2017, Vol. 64, No. 5, P. 635–648.
2. Matveeva T.V., Lutova L.A. *Horizontal gene transfer from Agrobacterium to plants//Front. Plant. Sci.* 2014. Vol.5. P.326.
3. Chen K., Otten L. *Natural Agrobacterium Transformants: Recent Results and Some Theoretical Considerations// Front. Plant Sci.*, 13 September 2017 | <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01600>
4. Comai, L.; Young, K.; Till, B. J.; Reynolds, S. H.; Greene, E. A.; Codomo, C. A.; Enns, L. C.; Johnson, J. E.; Burtner, C.; Odden, A. R.; Henikoff, S. *Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling// The Plant Journal*. 2004. Vol. 37. P. 778–786.
5. Hugenholtz P. *Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. // Genome biology*. 2002. Vol. 3. P. 0003.

УДК: 57.114/54.056

## СОЛЕВОЙ СТРЕСС ГРИБА *GANODERMA LUCIDUM*: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

М.С.Ярина<sup>1</sup>, Л.М.Краснопольская<sup>2</sup>, А.В.Марахнов<sup>2</sup>, Я.Шипилов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ НИИНА, Россия, 119021, Москва, Большая Пироговская, 11, maria.evsenko@gmail.com, 89175687212

<sup>2</sup> МГНЦ, Россия, 115522, Москва, Москворечье, 1, marakhonov@gmail.com,

*Ganoderma lucidum* и родственные виды способны к образованию биологически активных полисахаридов. Известно, что стрессы, вызываемые абиотическими и биотическими факторами, приводят к изменениям метаболизма грибов, в том числе базидиальных, однако влияние солевого стресса на гриб *Ganoderma lucidum* не изучено. Задача настоящей работы состояла в оценке влияния солевого стресса, вызванного хлоридом натрия, на рост гриба *G. lucidum* и образование им полисахаридов.

**Ключевые слова:** полисахариды, солевой стресс, микроморфология

*Ganoderma lucidum* и родственные виды способны к образованию биологически активных полисахаридов. (1) Известно, что стрессы, вызываемые абиотическими и биотическими факторами, приводят к изменениям метаболизма грибов, в том числе базидиальных, однако влияние солевого стресса на гриб *Ganoderma lucidum* не изучено. Задача настоящей работы состояла в оценке влияния солевого стресса, вызванного хлоридом натрия, на рост *G. lucidum* и образование полисахаридов.

Для выбора объекта исследования были изучены штаммы грибов, поступивших в нашу рабочую коллекцию как штаммы *G. lucidum*. С использованием молекулярно-филогенетических методов и методов построения филогенетических деревьев была установлена видовая принадлежность 4 штаммов.

Для дальнейшей работы был выбран штамм *G. lucidum*, способный к образованию щёлочерастворимых и водорастворимых полисахаридов, обладающих высокой противоопухолевой активностью и индуцирующих синтез цитокинов. (2,3,4) Щёлочерастворимый высокоразветвленный ксиломаннан проходит стадию доклинических исследований на данный момент.

Влияние хлорида натрия на рост *G. lucidum* изучали при его внесении в плотные и жидкие питательные среды для культивирования в количестве 0,5, 1,0, 1,5 и 2,0 %. Резкое уменьшение диаметра колонии гриба было отмечено на средах, содержащих 1,0 % и более хлорида натрия. При внесении в среду 2,0 % NaCl диаметр колонии *G. lucidum* составил 21,4 % от аналогичного показателя в контроле. Расчетная величина IC50 NaCl была равна 1,45 %. При внесении хлорида натрия в количестве от 0,5 до 2,0 % в питательную среду для погруженного культивирования отмечали постепенное уменьшение биомассы *G. lucidum* от 13,3 до 76,5 %, соответственно. Процесс носил линейный характер. Расчетная величина IC50 NaCl для погруженного культивирования составила 1,48 %. На средах, содержащих 12,5 г/л хлорида натрия и выше, было отмечено образование коричневого пигмента.

Изменение суммарного содержания полисахаридов в мицелии *G. lucidum* носило двухфазный характер: по отношению к контролю оно постепенно уменьшалось до 84,6 % при 1,0 % NaCl, а затем возрастало до 171,6 % при 2,0 % NaCl. Изменения суммарного содержания белков в мицелии также проходило в две фазы. Возрастание концентрации хлорида натрия в среде до 1,0 % сопровождалось повышением содержания суммарных белков в мицелии до 167,2% по сравнению с аналогичным показателем в контроле. Дальнейшее увеличение содержания NaCl в жидкой среде до 2,0 % сопровождалось постепенным понижением содержания белков до 137,7 % по отношению к контрольному показателю.

Проведенное исследование с помощью световой и сканирующей микроскопии выявило микроморфологические изменения погруженного мицелия *G. lucidum* при росте на средах, содержащих NaCl. В частности, было отмечено увеличение количества хламидоспор и кристаллов на гифах по мере увеличения концентрации хлорида натрия, и были выявлены ранее не описанные шарообразные структуры.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения о различных стратегиях выживания, используемых *G. lucidum* при различной стрессорной нагрузке.

### Литература:

1. Автономова А.В., Краснопольская Л.М. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum*) // Микология и фитопатология, 2013. – Т. 47. – Вып. 1. – С. 3-11. 2. Евсенко М.С., Шашков А.С., Краснопольская Л.М., Усов А.И. Полисахариды базидиальных грибов. Растворимые в щёлочи полисахариды из мицелия трутовика лакированного *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P.Karst//Биохимия -2009.

-№ 74.-вып. 5, -С.657-667 З.Ярина, М. С., Краснополяская, Л. М., Усов, А. И., Марахонов, А. В. (2017). Биологически активный полисахарид из погружённого мицелия гриба рода *Ganoderma* P. Karst. Биотехнология: состояние и перспективы развития (pp. 593-595). 4.Бляхер М. С. и др. Способность мононуклеаров периферической крови человека продуцировать цитокины при воздействии на них ксиломаннаном *in vitro* //Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – №. 5.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00961 мол\_а

UDC: 57.114/54.056

## SALT STRESS ON GANODERMA LUCIDUM: MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMISTRY ASPECTS

M.Yarina<sup>1</sup>, L.Krasnopolskaya<sup>2</sup>, A.Marakhonov<sup>2</sup>, Y.Shipilov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GINA, Russia, 119021, Moscow, Bolshaja Pirogovskaja, 11

<sup>2</sup>Research Centre for Medical Genetics, Russia, 115522, Moscow, Moskvorech, 1

*Ganoderma lucidum* strains are able to produce biologically active polysaccharides. It is widely known that stresses are inducing alteration of metabolome. However, the salt stress effect on *G. lucidum* has not been studied yet. The purpose of this work was to assess the impact of sodium chloride stress on the mycelia *G. lucidum* growth and polysaccharide production.

**Key words:** polysaccharides, sodium chloride stress, micromorphological

*Ganoderma lucidum* strains are able to produce biologically active polysaccharides.(1) It is widely known that stresses are inducing alteration of metabolome. However, the salt stress effect on *G. lucidum* has not been studied yet. The purpose of this work was to assess the impact of sodium chloride stress on the mycelia *G. lucidum* growth and polysaccharide production.

We have examined several strains from our samples for the main work objective determination. An identification of ITS rDNA sequences has been conducted with a purpose of specifying the taxonomic position of four strains.

For further work we selected *G. lucidum* strains capable of forming an alkali-soluble and water-soluble polysaccharides with high antitumor activity and capability to cytokines induction.(2,3,4) Preclinical trials of an alkali-soluble highly branched xylomannan are in progress now.

NaCl effect on the growth of *G. lucidum* was studied during its introduction into the dense and liquid nutrient culture medium in an amount of 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0%. The sharp reduction of fungus colony diameter was observed in medium containing 1.0% or more of sodium chloride. When we added 2.0% NaCl to the dense medium *G. lucidum* colonies diameter was 21.4% of that of the control. IC50 NaCl estimated concentration was 1.45%.When concentration of chloride in the liquid medium was from 0.5 to 2.0%, we observed the gradual decrease *G. lucidum* biomass from 13.3 to 76.5%, respectively. The process was linear. Estimated concentration of the IC50 NaCl for submerged cultivation was 1.48%. In medium containing 12.5 g/l of sodium chloride and above, we observed the formation of brown pigment.

The total polysaccharides in *G. lucidum* mycelium have been gradually reduced to 84.6% with 1,0% NaCl, and then have been increased to 171, 6% with 2,0% NaCl to the control. Increase of sodium chloride concentrations in the liquid medium to 1.0% has been accompanied by an increase of the total protein in the mycelium to 167.2% compared with that in the control. Further increase of NaCl in the liquid medium to 2.0% was accompanied by a gradual decrease in protein up to 137.7 % to the benchmark.

We used the method of light microscopy and method of scanning electron microscopy to reveal micromorphological changes of immersed *G. lucidum* mycelium when it is grown in medium containing NaCl. In particular, we observed «ball-like» structures, an increase of chlamydo spores and hyphae crystals with increase of sodium chloride concentration.

The obtained results support the assumption of different survival strategies used by *G. lucidum* under different stress load.

### References:

1. A.V. Avtonomova, L.M. Krasnopolskaya Anticancer and immunomodulating properties of the reishi (*Ganoderma lucidum*) // *Mycology and phytopathology*, 2013. - Vol. 47. - Issue. 1. - P. 3-11.
2. Evsenko M.S., Shashkov A.S., Krasnopolskaya L.M., Usov A.I. Polysaccharides of basidiomycetes. Soluble in alkali polysaccharides from the mycelium of the tinder lacquered *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst // *Biochemistry-2009*. - No. 74.-Issues. 5,

-pp.657-667 3. Yarina M.S., Krasnopol'skaya L.M., Usov A.I., Marakhonov A.V. . *Biologically active polysaccharide from immersed mycelium of the genus Ganoderma P. Karst.// Biotechnology: state and development prospects-2017- pp. 593-595* 4. Blyakher M.S. et al. *The ability of human peripheral blood mononuclear cells to produce cytokines when exposed to xylomannan in vitro // Medical Immunology. - 2017. - T. 19. -*

**Grant:** This work was supported by a grant РФФИ 18-34-00961 мол\_а

# ГЕНОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

## GENETIC ENGINEERING

### ПРИОРИТЕТ 20В СТРАТЕГИИ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ РФ: ТЕХНОЛОГИИ ЗДОРОВЬЕСБЕРЕЖЕНИЯ, ГЕНОМНАЯ И ПОСТГЕНОМНАЯ МЕДИЦИНА

### STRATEGY FOR SCIENCE AND TECHNOLOGY DEVELOPMENT OF RUSSIA, PRIORITY 20V: TECHNOLOGIES FOR HEALTH, GENOMIC AND POSTGENOMIC MEDICINE

1. АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКОВ И ПРОФИЛИ ИХ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ, Савосина П.И. ....	46
ALTERNATIVE SPLICING, FUNCTIONAL CHARACTERS OF PROTEINS AND THEIR PROFILES OF PHOSPHORYLATION, Savosina P.I. ....	47
2. БАКТЕРИИ RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НОВИЧОК СРЕДИ МИКРОБНЫХ ПЛАТФОРМ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ, Лавров К.В., Яненко А.С. ....	48
BACTERIA RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS - A PERSPECTIVE NEWCOMER AMONG MICROBIAL PLATFORMS FOR BIOTECHNOLOGY, Lavrov K.V. Yanenko A.S. ....	49
3. ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ CASA ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ СПОСОБОВ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, А.С. Савинова, Е.Ю. Коптев, В.А. Гушчин ....	50
POTENTIAL USE OF CASA FOR DEVELOPING NEW WAYS OF PATHOGENIC DISEASE DETECTION, A.Savinova , E.Koptev, V.Gushchin ....	51
4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОМОТОРОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ РАКА, Шепелев М. В., Калинин С. В., Саакян Е. К., Коробко И. В. ....	52
GENETIC ELEMENTS FOR ENHANCEMENT OF ACTIVITY OF TUMOR-SPECIFIC PROMOTORS FOR CANCER GENE THERAPY, Shepelev M. V., Kalinichenko S. V., Saakian E. K., Korobko I. V. ....	53
5. ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПРОТЕОМА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРОТЕОМИКИ, Поверенная Е.В., Пономаренко Е.А., Киселева О.И., Ильгисонис Е.В., Нарыжный С.Н., Копылов А.Т., Згода В.Г., Арчаков А.И. ....	54
HUMAN PROTEOME HETEROGENITY FOR SOLVING PROBLEMS OF CLINICAL PROTEOMICS, Poverennaya E.V., Ponomarenko E.A., Kiseleva O.I., Ilgisonis E.V, Naryzhny S.N., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Archakov A.I. ....	55
6. НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПОТОКОВ УГЛЕРОДА С ПОМОЩЬЮ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ, Голубева Л. И., Крылов А. А., Машко С. В. ....	56
RATIONAL DESIGN BASED ON GENOME EDITING THROUGH THE TARGETED CARBON FLUX REARRANGEMENT FOR ACHIVEMENT THE AIMS OF METABOLIC ENGINEERING, Golubeva L. I., Krylov A. A., Mashko S. V. ....	58
7. НЕОНАТАЛЬНАЯ НЕПЕРЕНОСИМОСТЬ ЛАКТОЗЫ ВЫЗЫВАЕТ ДОЛГОВРЕМЕННУЮ ФЕТАЛИЗАЦИЮ ФЕНОТИПА И ТРАНСКРИПТОМА КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС, Анацкая О. В., Рунов А. Л., Пономарцев С.В., Густайнис К. Р., Толкунова Е. Н., Харченко М. В., Гринчук Т.Н., Матвеев И. В., Вонский М. С., Казаченко А. А., Шахнович П. Г., Борхсениус С. Н. Коростин Д., Елмуратов А., Ильинский В., Красненко А., Ким А., Цыганов О. В., Цыганов В. Г., Томилин А. Н., Никольский Н. Н., Виноградов А. Е. ....	59
NEONATAL LACTOSE INTOLERANCE TRIGGERS LONG-TERM HENOTYPE AND TRANSCRIPTOME FETALIZATION In RAT CARDIOMYOCYTE, Anatskaya O.V., Runov A.L., Ponomartsev S.V., Gustainis K.R.,	

Tolkunova E.N., Kharchenko M.V., Grinchuk T.N., Matveev I. V., Vonsky M. S., Kazachenko A. A., Shakhnovitch P. G., Borkhsenius S. N., Korostin D., Elmuratov A., Il'insky V., Krasnenko A., Kim A., Tsyganov O.V., Tsyganov V.G., Tomilin A.N., Nikolsky N. N., Vinogradov A. E. ....	60
8. НОВЫЙ ФЕРМЕНТ ДНК-ПОЛИМЕРАЗА И ПРАЙМАЗА PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ, ТЕСТИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ IN VITRO, А.В.Макарова, Е.О.Болдинова, Р.Хайруллин, С.Горазд, Ш.Ванрой .....	62
NEW HUMAN DNA POLYMERASE AND PRIMASE PRIMPOL: OPTIMIZATION OF EXPRESSION, ACTIVITY TESTING AND CHARACTERIZATION OF PROPERTIES IN VITRO, A.Makarova, E.Boldinova, R.Khairullin, G.Stojkovič, S.Wanrooij .....	63
9. ОТСУТСТВИЕ ТУМОРОГЕННОСТИ У МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТЬЮ, ВЫЗВАННЫЙ СУБЛЕТАЛЬНЫМ ТЕПЛОВОМ ШОКОМ, Анацкая О.В., Шилина М.А., Виноградов А.Е., Алексеенко Л.Л., Кожухарова И.В. Пуговкина Н.А., Фридлянская И.И., Гринчук Т.М. Никольский Н.Н. ....	64
HUMAN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS WITH SUBLETHAL HEAT SHOCK INDUCED DNA INSTABILITY DO NOT SHOW HALLMARKS OF CANCER, Anatskaya O.V., Shilina M.A., Vinogradov A.E., Alekseenko L.L., Kozhoukharova I.V., Pougovkina N.A., Frydlyanskaya I.I., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N. ....	65
10. ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОЙ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКИ В ЭРУ ГЕНОМНЫХ И ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ, Лебедев И.Н. ....	65
FRONTIERS OF CLINICAL AND BASIC CYTOGENETICS IN THE ERA OF GENOME AND POSTGENOME TECHNOLOGIES, Lebedev I.N. ....	67
11. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО РЫНКА ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ, Кривенко А.Н., Кайшева А.Л., Федорончук Т.В. ....	68
DEVELOPMENT OF RUSSIA'S MARKET FOR POSTGENOME TECHNOLOGIES, Krivenko A.N., Kaysheva A.L., Fedoronchuk T.V. ....	69
12. ПЕРСПЕКТИВЫ РЕАЛИЗАЦИИ СТРАТЕГИИ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ОБЛАСТИ МЕДИЦИНЫ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПИЛОТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ «МЕДИЦИНА БУДУЩЕГО», Каминский И.П., Ваизова О.Е., Спицко Ж.А. Энглевский Н.А., Кокорина Д.А. ....	71
PERSPECTIVES OF IMPLEMENTATION OF THE STRATEGY OF SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF THE RUSSIAN FEDERATION IN THE FIELD OF MEDICINE: THE RESULTS OF THE PILOT STUDY OF THE TECHNOLOGY PLATFORM «MEDICINE OF THE FUTURE», Kaminskii I.P., Vaizova O.E., Spitsko Z.A., Englevskiy N.A., Kokorina D.A. ....	72
13. ПОДАВЛЕНИЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА L-АСПАРАГИНАЗОЙ RHODOSPIRILLUM RUBRUM, СВЯЗАННОЕ С ИНГИБИРОВАНИЕМ АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ, Плясова А.А., Жданов Д.Д., Покровская М.В., Покровский В.С., Александрова С.С., Соколов Н.Н. ....	73
RHODOSPIRILLUM RUBRUM L-ASPARAGINASE AFFECTS TUMOR GROWTH THROUGH TELOMERASE INHIBITION, Plyasova A.A., Zhdanov D.D., Pokrovskaya M.V., Pokrovsky V.S., Alexandrova S.S., Sokolov N.N. ....	74
14. ПОИСК ФАКТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ HTLV-1 С ПОМОЩЬЮ СКРИНИНГА БИБЛИОТЕКИ НОКАУТОВ GECKO, Атемасова А.А., Зотова А.А., Лопатухина Е.В., Мазуров Д.В. ....	75
SEARCHING FOR CELLULAR FACTORS INVOLVED IN HTLV-1 REPLICATION AND SELECTED AFTER GECKO LIBRARY SCREENING, Atemasova A.A., Zotova A.A., Lopatukhina E.V., Mazurov D.V. ....	76
15. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА DEBARYOMYCES HANSENIИ, Д.К.Армянинова, Д.С.Карпов, М.Котлов .....	77
DEVELOPMENT OF CRISPR/CAS9 SYSTEM FOR GENOME EDITING IN DEBARYOMYCES HANSENIИ, D.Armyaninova, D.Karpov, M.Kotlov .....	78
16. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ СЕКЦИОННОГО И ПОЛУ-ВИРТУАЛЬНОГО ДВУМЕРНОГО ГЕЛЬ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ESI LC-MS/MS, Е.С.Петренко, С.Н.Нарыжный .....	80
COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RESULTS OF SECTIONAL AND SEMI-VIRTUAL TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS USING ESI LC-MS/MS, E.Petrenko, S.Naryzhny .....	81
17. ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ТЕСТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПСИХИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ, Захарова Н.В., Низамутдинов И.И., Ильинский В.В., Резник А.М., Морозова А.Ю., Костюк Г.П. ....	82



GWAS EFFICACY AND SAFETY PSYCHOPHARMACOTHERAPY, Zakharova N.V., Nizamutdinov I.I., Ilinsky V.V., Reznik A.M., Morozova A.Y., Kostyuk G.P. ....	83
18. ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК: ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ РЕАКЦИИ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ПОЛИМЕРАЗАМИ СЕМЕЙСТВ, А И В, Павлов А.С., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Чудинов А.В., Лапа С.А. ....	83
ENZYMATIC PREPARATION OF MODIFIED DNA: STUDY OF THE REACTION KINETICS BY THE METHOD OF REAL-TIME PCR WITH POLYMERASES OF FAMILIES A AND B, Pavlov A.S., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V., Lapa S.A. ....	85
19. ЧТО СКРЫВАЮТ САМЫЕ ИЗУЧАЕМЫЕ БЕЛКИ И МЕТАБОЛИТЫ?, Ильгисонис Е.В., Лисица А.В. ....	87
WHAT IS BEHIND THE MOST STUDIED PROTEINS ANS METABOLICS?, E. Ilgisonis, A.V. Lisitsa .....	87
20. SLYD-ДЕФИЦИТНЫЕ ШТАММЫ E.COLI КАК НОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ БЕЛКОВ, Е.А.Василенко, К.А.Кувалдина, Е.Н.Горшкова, И.В.Астраханцева, Д.В.Новиков, В.В.Мохонов .....	88
SLYD-DEFICIENT E.COLI STRAINS AS A NEW PLATFORM FOR PROTEIN EXTRACTION, E.Vasilenko, K.Kuvaldina, E.Gorshkova, I.Astrakhtantseva, D.Novikov, V.Mokhonov .....	89

УДК 577.112.5

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКОВ И ПРОФИЛИ ИХ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

**Савосина П.И.**

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ)*

*119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8*

*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (РНИМУ),*

*117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1*

*e-mail: polinkasavosina@gmail.com*

Исследованы структурно-функциональные различия между белковыми изоформами, возникающими вследствие альтернативного сплайсинга. Выявлено изменение профилей фосфорилирования в изоформах, кодируемых одним и тем же геном, а также связанные с этим функциональные характеристики.

**Ключевые слова:** альтернативный сплайсинг, транскрипты, белковые изоформы, посттрансляционное фосфорилирование белков

Благодаря наличию альтернативных стартовых кодонов и альтернативному сплайсингу общее количество белков, экспрессируемых в организмах эукариот, превышает число белок-кодирующих генов. Показано, что около половины генов человека кодирует два или более вариантов зрелой мРНК (транскриптов). Однако далеко не для всех этих транскриптов экспериментально подтверждено наличие соответствующих белковых изоформ. В данной работе мы исследовали структурно-функциональные различия между белковыми продуктами одних и тех же генов, связанные с изменением профилей фосфорилирования. Для исследования были выбраны продукты 276 генов 18-ой хромосомы человека. Сведения о транскриптах были извлечены из базы знаний UniProtKB и портала Gene-NCBI. Данные об экспрессии соответствующих белков и их функциональных особенностях были получены при анализе литературных источников. Нам удалось найти экспериментальные данные, подтверждающие наличие изоформ на белковом уровне, лишь для 20 генов. Структурные различия между белковыми продуктами связаны с наличием/отсутствием сигнальных последовательностей или целых доменов. Это сказывается на тканевой специфичности и клеточной локализации белка, а также на его взаимодействии с молекулами субстратов и эффекторов. Изменения в профилях фосфорилирования вследствие вставки или утраты сайт-содержащих фрагментов связаны с регуляторными процессами, в которых участвуют разные белковые изоформы. Полученные результаты будут использованы при изучении характеристик сплайсинговых вариантов, которые позволяют сохранять структурную стабильность кодируемых белков и обуславливают функциональные особенности изоформ.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг.

UDC 577.112.5

## ALTERNATIVE SPLICING, FUNCTIONAL CHARACTERS OF PROTEINS AND THEIR PROFILES OF PHOSPHORYLATION

Savosina P.I.

*Institute of Biomedical Chemistry (IBMC)  
119121, Moscow, Pogodinskaya Street, 10, building 8  
Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU)  
117997, Moscow, Ostrovitianov str. 1  
e-mail: polinkasavosina@gmail.com*

The structural and functional differences between protein isoforms arisen from the alternative splicing. We revealed the changes in phosphorylation profiles of isoforms encoded by the same gene, as well as related functional features.

**Key words:** alternative splicing, transcripts, protein isoforms, post-translational phosphorylation of proteins

The total number of proteins expressed in eukaryotic organisms exceeds the number of protein-coding genes due to alternative start codons and alternative splicing. It is shown that about half of human genes encode two or more variants of mature mRNA (transcripts). However, the existence of the corresponding protein isoforms is not experimentally confirmed for all these transcripts. In this research, we investigated the structural and functional differences between protein products of the same genes associated with the change in phosphorylation profiles. For this study, were selected products of 276 genes of the human 18th chromosome. Information about transcripts was retrieved from UniProtKB knowledge base and Gene-NCBI portal. Data on the expression of the corresponding proteins and their functional characteristics were obtained by analyzing literature sources. We managed to find the experimental data confirming the presence of isoforms at the protein level only for 20 genes. The structural differences between protein products are linked with presence/absence of the signal sequences or entire domains. It impacts on the tissue specificity and cellular localization of the protein as well as its interactions with the substrates and effectors molecules. The changes in phosphorylation profiles because of the insertion or loss of site-containing fragments are related to regulatory processes, in which the differed protein isoforms participate. The obtained results will be used to investigate the features of splice variants, which allow keeping the structural stability of encoded proteins and condition specific functional peculiarities of isoforms.

**Acknowledgement.** The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013–2020.

УДК 577.11.083

## БАКТЕРИИ RHODOCOCCUS RHODOCHROUS – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ НОВИЧОК СРЕДИ МИКРОБНЫХ ПЛАТФОРМ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Лавров К.В., Яненко А.С.

*ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация  
lavrov.ko@gmail.com, yanenko@genetika.ru*

Рассмотрены особенности бактерий *Rhodococcus*, позволяющие использовать их в качестве одной из современных микробных платформ для биотехнологии. Суммирован опыт ГосНИИгенетика в изучении и практическом применении этих бактерий, обозначены перспективы дальнейшего развития этих исследований.

**Ключевые слова:** микробная платформа, биотехнология, бактерии, *Rhodococcus*, акриловые мономеры.

Современная биотехнология производства аминокислот, антибиотиков, ферментов и пептидов невозможна без микроорганизмов – бактерий и низших грибов. Они обладают огромным разнообразием метаболитов и ферментов, легко перестраиваемым аппаратом генетической регуляции синтеза, способностью к сверх-экспрессии генов, высокой скоростью метаболизма. Высокими темпами растёт использование штаммов бактерий в качестве биофабрик для нужд фармацевтической, пищевой, лёгкой, добывающей, и

других отраслей промышленности.

Для эффективной разработки новых штаммов используются т.н. «микробные платформы» - микроорганизмы с разработанными методами генетического конструирования, инструментарием для экспрессии генов и редактирования геномов, секвенированным геномом, изученной физиологией (нпр., *Escherichia coli*, виды *Bacillus*, и несколько других). Однако, существующие платформы часто оказываются плохо пригодны для современных задач, из-за фундаментальных особенностей физиологии и генетики этих микроорганизмов. Принципиальное расширение набора микробных платформ стало необходимым для удовлетворения спроса со стороны биотехнологической промышленности.

Бактерии *Rhodococcus* выгодно отличаются от известных биотехнологических бактерий прочностью клеток и их устойчивостью к растворителям, приспособленностью к трансформации труднодоступных или токсичных соединений, проницаемостью клеточной стенки, нетребовательностью к питательной среде, способностью к росту при пониженных температурах.

В ГосНИИгенетика накоплены фундаментальные знания о генетике и физиологии родококков, разработан генно-инженерный инструментарий, в том числе: изучено применение интегративных фагов для введения ДНК в клетки [1], разработаны вектора для автономной и хромосомной экспрессии генов, методы редактирования генома [2], проводится секвенирование геномов родококков [3], охарактеризована эффективность ряда гетерологичных промоторов, показана возможность регуляции их активности [4, 5]. Активно изучается применение родококков для биокатализа: сконструированы штаммы, эффективно синтезирующие ферменты для биокаталитического получения спектра акриловых мономеров [6], внедрены процессы получения акриламида и акриловой кислоты, разрабатываются процессы получения N-замещённых акриламидов и метакриламида [7].

Накопленный опыт демонстрирует практическую ценность и реальную применимость бактерий *Rhodococcus* в качестве полноценной платформы для конструирования широкого круга продуцентов ферментов для биотехнологии.

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (соглашение № 16-14-00216).

#### Литература:

1. Voejkova T, T.V., Ryabchenko L, Mkrtyumyan N, Yanenko A., *Conjugative transfer of plasmid pT01 from Escherichia coli to Rhodococcus spp. Biotechnology Letters*, 1994. 16: p. 555-560.
2. Рябченко Л.Е., Полякова И.Н., Яненко А.С., *Мобилизуемые плазмидные векторы, способные к конъюгативному переносу между клетками E.coli и Rhodococcus и их использование для конструирования штаммов Rhodococcus. Биотехнология*, 2005. 5: с. 6-13.
3. Novikov, A. D. Lavrov, K. V. Kasianov, A. S. Gerasimova, T. V. Yanenko, A. S. *Draft Genome Sequence of Rhodococcus sp. Strain M8, Which Can Degrade a Broad Range of Nitriles. Genome Announcements*, 2018. 6(6).
4. Гречишникова Е.Г., Шемякина А.О., Лавров К. В., Яненко А.С. *Изучение функционирования набора промоторов в Rhodococcus rhodochrous. Материалы XIX Зимней молодежной школы по биофизике и молекулярной биологии. С-Петербург.*, 2018.
5. K.V. Lavrov, A.O.Shemyakina, E.G. Grechishnikova, A.D. Novikov, D.D. Derbikov, T.I. Kalinina, A.S. Yanenko, *New cblA gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in Rhodococcus rhodochrous. Research in Microbiology*, 2018. *Accepted, in press.*
6. К. В. Лавров, А.Д.Н., Л. Е. Рябченко, А. С. Яненко, *Экспрессия гена ациламидазы в штаммах Rhodococcus erythropolis. Генетика*, 2014. 50(9): с. 1133-1137.
7. К.В. Лавров, Г.А.Ларинова, А.С. Яненко, *Новый биокаталитический процесс - синтез N-замещённых акриламидов. Биотехнология*, 2012. 4: с. 26-30.

UDC 577.11.083

## BACTERIA RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS - A PERSPECTIVE NEWCOMER AMONG MICROBIAL PLATFORMS FOR BIOTECHNOLOGY

Lavrov K.V. Yanenko A.S.

State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation  
 lavrov.ko@gmail.com, yanenko@genetika.ru

The peculiarities of *Rhodococcus* bacteria are considered, which make it possible to use them as one of the modern microbial platforms for biotechnology. The experience of GosNIIGenetika is summarized in the study and practical

application of these bacteria, the prospects for further development of these studies are outlined.

**Key words:** microbial platform, biotechnology, bacteria, *Rhodococcus*, acrylic monomers.

Modern biotechnology for the production of amino acids, antibiotics, enzymes and peptides is impossible without microorganisms - bacteria and lower fungi. They possess a huge variety of metabolites and enzymes, an easily tuned apparatus for genetic regulation of synthesis, the ability to over-express genes, a high metabolic rate. The use of strains of bacteria as bio-factories for the needs of pharmaceutical, food, mining, and other industries is growing at a high rate.

To efficiently develop new strains, the so-called "microbial platforms" are commonly used. "Platform" means microorganism with elaborated genetic engineering methods, tools for gene expression and genome editing, a sequenced genome, studied physiology (eg, *Escherichia coli*, *Bacillus* species, and several others). However, existing platforms often prove to be poorly suited to modern tasks, due to the fundamental features of the physiology and genetics of these microorganisms. The basic expansion of a set of microbial platforms has become necessary to meet the demand from the biotechnology industry.

Bacteria *Rhodococcus* favorably differ from known biotechnological bacteria by the strength of cells and their resistance to solvents, the ability to transform difficult-to-reach or toxic compounds, the permeability of the cell wall, the undemanding to a nutrient medium, the ability to grow at low temperatures.

GosNIIgenetika has accumulated fundamental knowledge about genetics and physiology of rhodococci, developed genetic engineering tools, including: the use of integrative phages for introducing DNA into cells was studied [1], vectors for autonomous and chromosomal gene expression, methods for genome editing [2], sequencing of genomes of rhodococci is conducted [3], the efficiency of a number of heterologous promoters is characterized, the possibility of regulation of their activity is shown [4, 5]. The use of rhodococci for biocatalysis is actively studied: strains that efficiently synthesize enzymes for biocatalytic preparation of the spectrum of acrylic monomers are developed [6], processes for the production of acrylamide and acrylic acid are commercialized, and processes are being developed for the production of N-substituted acrylamides and methacrylamide [7].

The accumulated experience demonstrates the practical value and real applicability of *Rhodococcus* bacteria as a full-fledged platform for constructing a wide range of enzyme producers for biotechnology.

Funding: this work was supported by Russian Science Foundation (project №16-14-00216).

#### References:

1. Voeykova T, T.V., Ryabchenko L, Mkrtyumyan N, Yanenko A. *Conjugative transfer of plasmid pTO1 from Escherichia coli to Rhodococcus spp. Biotechnology Letters*, 1994. 16: p. 555-560.
2. Ryabchenko L.E., Polyakova I.N., Yanenko A.S. *Mobilizable plasmid vectors capable of conjugative transfer between E. coli and Rhodococcus and their application to construction of Rhodococcus strains. Biotechnology (Mosc)*, 2005. 5: p. 6-13.
3. Novikov, A. D. Lavrov, K. V. Kasianov, A. S. Gerasimova, T. V. Yanenko, A. S. *Draft Genome Sequence of Rhodococcus sp. Strain M8, Which Can Degrade a Broad Range of Nitriles. Genome Announcements*, 2018. 6(6).
4. Grechishnikova E.G., Shemyakina A.O., Lavrov K.V., Yanenko A.S. *A study of the functioning of a set of promoters in Rhodococcus rhodochrous. Materials of the XIX Winter Youth School on Biophysics and Molecular Biology. St. Petersburg*, 2018.
5. K.V. Lavrov, A.O.S., E.G. Grechishnikova, A.D. Novikov, D.D. Derbikov, T.I. Kalinina, A.S. Yanenko, *New cbIA gene participates in regulation of cobalt-dependent transcription of nitrile hydratase genes in Rhodococcus rhodochrous. Research in Microbiology*, 2018. Accepted, in press.
6. K.V. Lavrov, A.D. Novikov, L.E. Ryabchenko, A.S. Yanenko. *Expression of the acylamidase gene in Rhodococcus erythropolis strains. Genetika (Mosc)*, 2014. 50(9): p. 1133-1137.
7. K.V. Lavrov, G.A. Larikova, A.S. Yanenko. *Novel biocatalytic process of N-substituted acrylamide synthesis. Biotechnology (Mosc)*, 2012. 4: p. 26-30.

УДК: 577.29, ББК: 28.04

## ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ CAS13A ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ СПОСОБОВ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.С.Савинова<sup>1</sup>, Е.Ю.Коптев<sup>2</sup>, В.А.Гущин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра биотехнологии, факультет биотехнологии и промышленной экологии Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева, Москва, Россия, 123098, Москва, Гамалеи, 18, alinabird@gmail.com, 89857498307

<sup>2</sup> Лаборатория трансляционной биомедицины, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва, Россия, 123098, Москва, Гамалеи, 18, alinabird@gmail.com, 89857498307

Получены и исследованы препараты рекомбинантного белка Cas13a, обладающего свойствами программируемой РНКазы. Показана возможность использования системы CRISPR-Cas13a в качестве эффективного метода детектирования РНК.

**Ключевые слова:** ПЦР, диагностика, инфекционные заболевания, CRISPR-Cas система, Cas13a.

На протяжении многих лет человечество борется с инфекционными заболеваниями. Ведется разработка новых методов диагностики, от точности которых прямо зависит эффективность последующей терапии. Так, для назначения наиболее эффективного и безопасного лечения необходимо в первую очередь определить причину болезни и ее свойства, например, для назначения антибиотиков предварительно изучить профиль антибиотикорезистентности. Золотым стандартом идентификации бактериальных инфекций до сих пор является культивирование на дифференциально-диагностических средах, однако метод требует больших затрат времени и тем не менее часто оказывается недостаточно точным.

Появление полимеразной цепной реакции (ПЦР) и геномного секвенирования позволило не только увеличить эффективность диагностики, но и разработать мобильные платформы для быстрого детектирования возбудителей инфекций и оказания медицинской помощи. Однако, дороговизна ПЦР-машин, проблема контаминации ампликонами в процессе ПЦР (появление ложноположительных результатов), необходимость предварительного выделения нуклеиновых кислот, высокая стоимость единичного исследования и необходимость высокой квалификации персонала накладывают ограничения на более широкое распространение методов анализа НК. Альтернативным подходом, позволяющим уйти от существенной части указанных выше ограничений является использование для диагностики мишень зависимых РНКаз типа CAS13a.

Адаптивная иммунная система бактерий CRISPR-Cas содержит в себе мишень программируемые эндонуклеазы, которые могут быть использованы для создания новых методов детектирования нуклеиновых кислот. Палиндромные повторы, сосредоточенные в локусе CRISPR, разделены фрагментами ДНК, заимствованными из чужеродных геномов (в основном бактериофагов и плазмид), с которыми клетке приходилось сталкиваться ранее. РНК-транскрипты этих локусов (CRISPR-РНК) позволяют CAS-белкам безошибочно нацеливаться на последовательности аллогенных нуклеиновых кислот и уничтожать их с использованием нуклеазной активности. Авторы Jonathan S. Gootenberg и Omar A. Abudayyeh в своей статье 2017 года на основе биохимических и генетических экспериментов изложили концепцию детектирования РНК с помощью единичной гидовой РНК (егРНК) и белка Cas13a (ранее известного как C2c2).

Ученые установили, что белок Cas13a из рода *Leptotrichia* sp., в комплексе с егРНК, активированный заданной мишенью РНК, начинает проявлять неспецифическую РНКазную активность, что позволяет в присутствии флуоресцентного РНК репортера детектировать заданную егРНК мишень в аттомолярных концентрациях. Таким образом, регистрируя разрушение репортерной РНК, добавленной в образец, можно детектировать единичные молекулы целевых РНК, а значит диагностировать единичные клетки микробов или вирусные частицы.

В рамках работы лаборатории трансляционной биомедицины, взяв за основу вышеизложенную концепцию, было проведено исследование по проверке специфичной РНКазной активности кодон оптимизированного белка Cas13a *Leptotrichia wadei*. Ген, кодирующий белок Cas13a, был встроен в векторы рЕТ-42b(+) и рТХВ1. В первом случае в результате экспрессии гена получали Cas13a с аффинной полигистидиновой меткой, во втором случае — химерный белок с концевым интеиновым доменом, сайтами аутосплайсинга и хитинсвязывающим фрагментом. После разрушения клеток рекомбинантные белки оказывались в растворимой фракции лизата, окончательную очистку Cas13a проводили с помощью аффин-

ной хроматографии: на Hisprep™ Fast Flow 16/10(GE, США) или Chitinresin(NEB, США) по рекомендованным производителями протоколам. Препараты eРНК и мишени (фрагмент последовательности генома вируса гриппа В) получали транскрипцией *in vitro* с помощью T7 РНК-полимеразы с искусственно созданных генетических векторов.

Для детекции РНКазных активностей в реакционную смесь добавляли коммерческий флуоресцентно-меченный субстрат репортерной РНК RNaseAlert (ThermoFisherScientific, США). Для получения оптимальных значений флуоресценции провели серию модельных экспериментов с РНКазой А. Отсутствие сторонних РНКазных активностей и неспецифической ферментативной активности Cas13а подтверждали с помощью эксперимента, где отсутствовали мишень и активирующая eРНК. В качестве мишени использовали искусственно полученные фрагменты РНК вирусов гриппа А, гриппа В и ТОРС. Были проведены опыты по определению специфичности действия полученных препаратов Cas13а, где варьировали концентрации мишени, eРНК и Cas13а. Все серии опытов по исследованию свойств препаратов Cas13а проводили при постоянной температуре 37°C, детекцию флуоресцентного сигнала осуществляли в реальном времени флуориметрически с использованием амплификатора.

Было показано, что полученные препараты рекомбинантного Cas13а обладают свойствами программируемой РНКазы, что даёт возможность в будущем создать новые эффективные системы диагностики инфекционных заболеваний. Использование данной технологии может позволить снизить стоимость, сократить время анализа за счет прямой детекции без выделения НК, исключить необходимость сложного диагностического оборудования, а также исключить риск контаминации.

Литература:

1. Abudayyeh O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // *Science*. – 2016. – Т. 353. – №. 6299. – С. aaf5573. 2. Fournier P. E., Dubourg G., Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era // *Genome medicine*. – 2014. – Т. 6. – №. 11. – С. 114. 3. Gootenberg J. S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 // *Science*. – 2017. – С. eaam9321.

UDC 577.29, BBC 28.04

## POTENTIAL USE OF CAS13A FOR DEVELOPING NEW WAYS OF PATHOGENIC DISEASE DETECTION

A.Savinova<sup>1</sup>, E.Koptev<sup>2</sup>, V.Gushchin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Industrial Ecology D.I Mendeleev University of chemical technology of Russia, Moscow, Russia, Russian Federation, 123098, Moscow, Gamaleya, 18

<sup>2</sup> Laboratory of translational biomedicine, N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology & Microbiology, Moscow, Russia, Russia, 123098, Moscow, Gamaleya, 18

Recombinant Cas13a protein with properties of programmable endonuclease was created. The possibilities of using CRISPR-Cas13a system as an effective method of RNA detection were shown.

**Key words:** PCR, diagnostics, pathogenic diseases, CRISPR-Cas system, Cas13a.

Over the centuries, humankind is struggling with pathogenic diseases. New diagnostic methods, the level of which directly affects the effectiveness of therapy, are being developed. So, for the purpose of the most effective and safe treatment it is necessary first of all to determine the cause of the disease and its properties, for example, to prescribe antibiotics it is necessary beforehand to study the profile of antibiotic resistance. The “gold standart” in case of diseases caused by microorganisms is their cultivation using differential-diagnostic media, but this approach is very time-consuming and yet often is not accurate enough.

The invention of polymerase chain reaction (PCR) and genomic sequencing gave the opportunity to increase the effectiveness of diagnostics and to develop mobile platforms for fast detection of pathogens and early treatment of the disease. However, the high cost of PCR machines, the problem of contamination with amplicons in the PCR process (the appearance of false positive results), the need for preliminary isolation of nucleic acids, the high cost of a single study and the need of the personnel with high qualification impose limitations on the wider dissemination of nucleic acids analysis methods. An alternative approach that allows to get away from a significant part of the above limitations is the use of target-dependent RNase CAS13a for diagnostic purposes.

Adaptive immune system CRISPR-Cas of bacteria contains target-programmable endonucleases that can be used in developing of new methods of DNA and RNA detection. CRISPR locus consist of DNA fragments, copied from the foreign genome( generally bacteriophages and plasmids), and divided by palindromic repeats.. RNA-

transcripts of these locuses (CRISPR-RNA) allow CAS-proteins to aim at allogenic sequences and destroy them with nuclease activity. Researchers Jonathan S. Gootenberg and Omar A. Abudayyeh (2017) presented the concept of RNA detection with single guide RNA (crRNA) Cas13a protein (earlier known as C2c2) basing on biochemical and genetical experiments. They have shown that Cas13a from *Leptotrichia* spin combination with sgRNA activated by target RNA, begins to exhibit nonspecific RNase activity, which allows in the presence of a fluorescent RNA reporter to detect a target in attomolar concentrations. Thus, the registration of reporter RNA split in the sample allows the detection of single molecules of required nucleic acids and therefore to diagnose single cells of microbes or virus particles.

Using the given approach, the test of specificity of codon optimized Cas13a *Leptotrichia wadei*. ribonuclease activeness was ran in our laboratory of translational biomedicine. The gene that codes Cas13a was incorporated into the vectors pET-42b(+) and pTXB1. In the first case we got the Cas13a with affine polyhistidine tag and in the other case – fused protein with intein end domaine, sites of selfsplicing and chitin-linking fragment. After the destruction of cells the recombinant proteins appeared in the soluble fraction of the lysate. The final purification of Cas13a was made using affine chromatography (Hisprep™ Fast Flow 16/10 (GE, USA) or Chitin resin (NEB, USA)) using standard recommended protocols. CrRNA and targets (fragments of influenza type B genome sequence) were obtained using in vitro transcription with T7 RNA polymerase from the artificial vectors.

Fluorescently-labelled substrate of reporter DNA RNaseAlert (Thermo fisher scientific, USA) was added into the reaction mixture in order to detect the ribonuclease activeness. The number of tests with A-ribonuclease were ran to reveal the optimal parameters of fluorescence. The absence of foreign ribonuclease activenesses and unspecific Cas13a fermentative activeness was proved by the experiment with the absence of the target and crRNA. The target was artificially obtained fragments of RNA of influenza A, influenza B and SARS. The number of the experiments with different target, crRNA and Cas13a concentrations were aimed to detect the specificity of the revealed Cas13a loads. All of the experiments were taken under the 37°C conditions with live fluorimetric detection of the signal, using the amplification system.

Revealed recombinant Cas13a proteins have shown the properties of programmable ribonuclease which allows the development of new effective diagnostic platforms in the future. The use of this technology can reduce costs, minimize the time of analysis through direct detection without isolation of nucleic acids, eliminate the need for complex diagnostic equipment and the risk of contamination.

#### References:

1. Abudayyeh O. O. et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector // *Science*. – 2016. – Т. 353. – №. 6299. – С. aaf5573.
2. Fournier P. E., Dubourg G., Raoult D. *Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era // Genome medicine*. – 2014. – Т. 6. – №. 11. – С. 114.
3. Gootenberg J. S. et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2 // *Science*. – 2017. – С. eaam9321.

УДК 577.21

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ПРОМОТОРОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Шепелев М. В., Калиниченко С. В., Саакян Е. К., Коробко И. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия, 119334, ул. Вавилова, д. 34/5  
 e-mail: mshepelev@mail.ru

Исследована способность цис-действующих генетических элементов ARE, XRE и PXRE повышать активность опухолеспецифического промотора hTERT.

**Ключевые слова:** промотор hTERT, ARE (элементы антиоксидантного ответа), XRE (элементы ответа на ксенобиотики), PXRE (элементы ответа на PXR), генная терапия рака, опухолеспецифический промотор.

Одна из часто используемых стратегий обеспечения специфичности генной терапии рака заключается в активации экспрессии терапевтического трансгена преимущественно в опухолевых клетках за счет опухолеспецифических промоторов, например, промотора гена теломеразы человека (hTERT). Однако промотор hTERT достаточно слабый, что может влиять на эффективность генной терапии. Для исследования возможности повышения активности промотора hTERT с сохранением его опухолеспецифичности нами были созданы гибридные промоторы на основе hTERT, включающие генетические элементы, способные активировать транскрипцию в ответ на различные опухолеспецифические молекулярные стимулы. Эле-

менты XRE из промотора гена CYP1A1 человека являются мишенью транскрипционного фактора AhR (Aryl hydrocarbon receptor), который стимулируется ксенобиотиками и метаболитами, и часто aberrантно активирован в опухолевых клетках. Было установлено, что XRE элементы при комбинации с hTERT промотором существенно повышают активность гибридного промотора как в клеточных линиях рака легких человека, так и в линии неопухолевых клеток эпителия бронхов. При этом активность такого гибридного промотора усиливалась пропорционально числу XRE элементов в промоторе и в ответ на обработку клеток бензпиреном, лигандом AhR. Таким образом, добавление элементов XRE позволяет существенно увеличить активность промотора hTERT, но не сохраняет опухолевой специфичности, что делает элементы XRE непригодными для создания опухолеспецифических промоторов с повышенной активностью. Элементы PXRE из промотора гена ABCB1 (MDR1) человека являются мишенью транскрипционного фактора PXR (Pregnane X receptor), лигандами которого являются метаболиты и ксенобиотики, включая многие химиотерапевтические препараты. Было установлено, что модификация промотора hTERT с помощью элементов PXRE не влияет на его транскрипционную активность в клетках рака легких человека, а обработка клеток рифампицином, лигандом PXR, не стимулирует активность гибридного промотора. Это может быть обусловлено выявленным нами крайне низким уровнем экспрессии мРНК PXR в клетках рака легких человека. Мы предполагаем, что гибридный промотор PXRE-hTERT может быть применим в опухолевых клетках, которые приобрели множественную лекарственную устойчивость из-за активации гена MDR1 вследствие aberrантной активации PXR. Генетический элемент ARE из промотора гена GCLM человека является мишенью транскрипционного фактора Nrf2, активирующего гены защиты от окислительного стресса, повышенный уровень которого присущ опухолевым клеткам. Нами показано, что активность гибридного промотора ARE-hTERT была выше в трех из четырех клеточных линий рака легкого человека как при измерении активности репортерного гена люциферазы, так и в *in vitro* схеме суицидальной генной терапии рака фермент-пролекарство ЦД:УФРТ–5ФЦ. Важно отметить, что активность гибридного промотора ARE-hTERT не повышалась в неопухолевых клетках эпителия бронхов человека, что указывает на отсутствие влияния ARE на опухолеспецифичность промотора hTERT. Таким образом, был создан новый гибридный промотор ARE-hTERT, который сохраняет опухолеспецифичность промотора hTERT и характеризуется повышенной транскрипционной активностью в опухолевых клетках.

UDC 577.21

## GENETIC ELEMENTS FOR ENHANCEMENT OF ACTIVITY OF TUMOR-SPECIFIC PROMOTORS FOR CANCER GENE THERAPY

Shepelev M. V., Kalinichenko S. V., Saakian E. K., Korobko I. V.

*Institute of gene biology, Russian academy of sciences, Moscow, Russia, 119334, 34/5 Vavilova Str. e-mail: mshepelev@mail.ru*

The ability of cis-acting genetic elements ARE, XRE and PXRE to enhance the activity of tumor-specific promoter hTERT was investigated.

**Key words:** hTERT promoter, ARE (antioxidant response element), XRE (xenobiotic response element), PXRE (PXR response element), cancer gene therapy, tumor-specific promoter.

One of the commonly used strategies to provide the specificity of cancer gene therapy is to activate the expression of a therapeutic transgene selectively in cancer cells by using tumor-specific promoters, e.g. human telomerase gene promoter (hTERT). But the hTERT promoter is reasonably weak thus compromising the efficiency of gene therapy. In order to evaluate the possibility of increasing the hTERT promoter activity without compromising its tumor specificity we created the hTERT-based hybrid promoters which include genetic elements that are capable of activating transcription in a response to various tumor-specific stimuli. XRE element from human CYP1A1 gene promoter is a target for AhR (Aryl hydrocarbon receptor) transcription factor that is stimulated by xenobiotics and metabolites and is often aberrantly activated in tumor cells. Here we show that XRE elements when combined with hTERT promoter significantly increase the activity of the hybrid promoter in human lung cancer cell lines and in non-tumorous bronchial epithelial cells. The activity of the hybrid promoter was increased proportionally to the number of XRE elements in the promoter and in the response to AhR ligand (benzo(a)pyrene) treatment. Thus, the addition of XRE elements can substantially elevate the activity of the hTERT promoter, but does not maintain the tumor specificity of the promoter. Therefore, XRE elements are not suitable for generation of tumor-specific promoters with an increased activity. PXRE element from human ABCB1 (MDR1) gene promoter is a target for PXR (Pregnane X



receptor) transcription factor. PXR ligands include metabolites and xenobiotics, including many chemotherapeutic drugs. We found that PXRE modification of the hTERT promoter does not affect its transcriptional activity in human lung cancer cells and PXR ligand (rifampicin) treatment does not stimulate the activity of the hybrid promoter. This can be attributed to an extremely low level of PXR mRNA expression that we found in human lung cancer cells. We propose that the hybrid PXRE-hTERT promoter could be used in tumor cells with MDR1-dependent multiple drug resistance due to aberrant activation of PXR. ARE element from human GCLM gene promoter is a target for Nrf2 transcription factor that activates genes to protect cells from oxidative stress that is hallmark of tumor cells. We found that the activity the ARE-hTERT hybrid promoter is increased in three out of four human lung cancer cell lines in both luciferase reporter gene assay and in in vitro CD:UPRT-5FC enzyme-pro-drug scheme of suicide cancer gene therapy. Of notion, the activity of the hybrid ARE-hTERT promoter was not increased in non-tumorous bronchial epithelial cells indicating that ARE does not compromise the tumor specificity of the hTERT promoter. In conclusion, we constructed a novel hybrid ARE-hTERT promoter that retains the basal hTERT promoter tumor specificity and possesses the increased activity in tumor cells.

УДК 577.1, 57.088

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПРОТЕОМА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРОТЕОМИКИ

**Поверенная Е.В., Пономаренко Е.А., Киселева О.И., Ильгисонис Е.В., Нарыжный С.Н., Копылов А.Т. Згода В.Г., Арчаков А.И.**

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

Для эффективного поиска и валидации биомаркеров необходимо понимание видового состава полного протеома человека и способов выявления протеоформ (протеотипирования). В рамках развития персонализированной медицины и международных проектов по исследованию протеома человека эти задачи трудно переоценить.

**Ключевые слова:** протеом человека, протеоформы, транскриптом, биомаркеры

Изменения в транскриптоме и протеоме сопровождают развитие большинства заболеваний человека. Разнообразие составляющих протеом человека белковых форм (протеоформ) колоссально: если число белок-кодирующих генов в геноме человека оценивается в 20 тыс., то число различных белковых вариантов достигает, по нашим самым скромным оценкам, 2 млн [Ponomarenko et al., 2016]. Это происходит за счёт экспрессии различных сплайс-вариантов транскриптов, редактирования мРНК и наличия посттрансляционных модификаций (ПТМ) белков. Кроме того, протеоформы возникают вследствие экспрессии различных аллельных вариантов генов. Последнее имеют наибольшее значение с точки зрения исследования онкологических заболеваний, при которых наблюдаются массовые геномные нарушения, включая точечные мутации и перестройки.

Одна из основных проблем разработки протеомных диагностических и прогностических наборов связана с гетерогенностью протеома и недостатком данных о референсных характеристиках протеома нормального человека: какие именно модифицированные формы белка экспрессируются в норме, какие при патологии, и каковы концентрационные диапазоны содержания этих форм белков у здорового человека.

Методы современной направленной масс-спектрометрии обладают чувствительностью 10-16 М, что позволяет детектировать наличие 600 молекул исследуемого белка в 1 мкл образца. Однако, на текущий момент нет подходов для описания протеоформ как для органов и тканей, так и для полного протеома.

В нашей работе для выявления протеоформ человека, являющихся следствием мутаций, альтернативного сплайсинга и ПТМ, мы предлагаем использовать комбинацию высокопроизводительного секвенирования транскриптома и дальнейшего протеомного анализа, выполненного с помощью 2DE с последующей масс-спектрометрией [Поверенная Е.В. и др., 2017]. Таким образом, удаётся совместить высокую чувствительность и высокую точность молекулярного анализа, оценив при этом изменения белков, поскольку далеко не всегда изменения, наблюдаемые на транскриптомном уровне, находят своё отражение на уровне протеома.

На примере клеточной линии HepG2 и клеток печени человека нам удалось увеличить количество идентифицированных протеоформ на 70-80% по сравнению с классическими подходами к инвентариза-

ции протеома. Сопоставление результатов транскриптомно-протеомного профилирования опухолевого образца с результатами аналогичного персонализированного исследования нормальных и пораженных другими патологиями тканей позволит выявить аномальные каскады реакций и биомаркеры, а также определить мишени для терапевтического вмешательства.

#### **Благодарности:**

Эта работа выполнена при финансовой поддержке РАН (Программа фундаментальных исследований 2013-2020 г.). Анализ данных и экспериментальная часть была выполнена с использованием оборудования ЦКП "Протеом человека", поддержанного Минобрнауки России в рамках выполнения соглашения № 14.621.21.0017 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017) Авторы благодарит ведущую научную школу академика РАН Андрея Валерьевича Лисицы (грант Президента Российской Федерации НШ-6313.2018.4)

#### *Литература:*

1. Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Pyatnitskiy M.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. The Size of the Human Proteome: the Width and Depth // *International journal of analytical chemistry*. – 2016. – P.7436849
2. Поверенная Е.В., Киселева О.И., Пономаренко Е.А., Нарыжный С.Н., Згода В.Г., Лисица А.В. Мультиомная стратегия исследования протеома клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 // *Биомедицинская химия*. – 2017.- Т.63, №5. – С. 373-378.

UDC 577.1, 57.088

## **HUMAN PROTEOME HETEROGENITY FOR SOLVING PROBLEMS OF CLINICAL PROTEOMICS**

**Poverennaya E.V., Ponomarenko E.A., Kiseleva O.I., Ilgisonis E.V, Naryzhny S.N., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Archakov A.I.**

*Institute of Biomedical Chemistry  
119121, Russia, Moscow, Posoginskaya str., bld 10/8  
e-mail: k.poverennaya@gmail.com*

Rational search and validation of biomarkers requires understanding of composition of whole human proteome and proteotyping approaches to reveal proteoforms. The importance of these tasks can hardly be overestimated in frames of development of personalized medicine.

**Key words:** human proteome, proteoforms, transcriptome, biomarkers

Development of most human diseases goes along with transcriptome and proteome alterations. The diversity and variability of the protein set composing whole human proteome is extremely high: whereas the number of protein-coding genes in human genome is about 20 thousand, the number of different protein species (proteoforms) is estimated as ca. 2 million by our modest computations [Ponomarenko et al., 2016]. This number is achieved due to expression of different splice-transcripts, mRNA variations, and post-translational modifications (PTM) of proteins. In addition proteoforms are coming from expression of different gene allelic variants. The expression of mutant gene variants is mostly important for diagnosis and prognosis of cancer accompanied by massive genomic aberrations including point mutations and large structural variations.

One of the most actual problems of development of diagnostic and prognostic proteomic biomarker kits are proteome heterogeneity and lack of data about characteristics of reference proteome: what modified proteoforms are preferentially expressed at normal conditions or in pathology, and what is the dynamic range of these proteoforms in healthy human.

Modern methods of targeted mass spectrometry achieved sensitivity of 10<sup>-16</sup> M, which allows to detect 600 protein molecules in 1 µl of sample. However, there're no approaches of comprehensive description of proteoforms, specific for different organs and tissues or complete proteome.

We propose to reveal human proteoforms resulted from point mutations, alternative splicing and PTM by means of highthroughput mRNA sequencing, followed by tandem of 2DE and shotgun MS [Poverennaya E.V. et al., 2017]. This approach allows to combine high sensitivity and accuracy of molecular analysis, as well as to estimate protein variations (having in mind that far from every genomic/transcriptomic changes are reflected on proteome level).

Example of HepG2 cell line and liver tissue demonstrated 70-80% gain in number of proteins identified by our

approach in comparison with traditional methods of proteome profiling.

Comparison of the results obtained by transcriptomic-proteomic profiling of tumor sample with the results of similar personalized study of normal tissues and tissues affected with different diseases will allow to reveal abnormal pathways and biomarkers and discover therapeutic targets.

#### Acknowledgments

This study was funded by the Russian Academy of Sciences (Fundamental Research Program for 2013–2020). Data analysis and experimental work was performed using equipment of “Human Proteome” Core Facility (Institute of Biomedical Chemistry) which is supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation (agreement 14.621.21.0017, unique project ID RFMEFI62117X0017). Authors acknowledge the Leading Scientific School of Prof. Andrey Lisitsa (grant the Russian Federation of President NSh-6313.2018.4).

#### References:

1. Ponomarenko E.A., Poverennaya E.V., Ilgisonis E.V., Pyatnitskiy M.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Lisitsa A.V., Archakov A.I. The Size of the Human Proteome: the Width and Depth // *International journal of analytical chemistry*. – 2016. – P.7436849
2. Poverennaya EV, Kiseleva OI, Ponomarenko EA, Naryzhny SN, Zgoda VG, Lisitsa AV. Multiomics study of HepG2 cell line proteome. // *Biomed Khim*. – 2017.- V.63, №5. – P. 373-378.

УДК 577.121:51-76

## НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПОТОКОВ УГЛЕРОДА С ПОМОЩЬЮ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Голубева Л. И., Крылов А. А., Машко С. В.

Закрытое акционерное общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика», Москва, Россия  
 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д.1 корп.1.  
 e-mail: luba\_golubeva@agri.ru

Методом  $^{13}\text{C}$ -MFA, проведен анализ перераспределения внутриклеточных потоков углерода в клетках *E. coli* в результате подавления экспрессии гена *rgi*, за счет встречной нетерминируемой транскрипции. Обсуждаются перспективы совместного использования подходов для целенаправленной модификации генома бактерий и методов анализа внутриклеточных потоков при решении задач метаболической инженерии.

**Ключевые слова:** анализ метаболических потоков, встречная нетерминируемая транскрипция, целенаправленное редактирование генома, НАДФН баланс.

В настоящее время прочно закрепилось мнение, что «... Сочетание аналитических методов расчета потоков и их контроль с помощью методов молекулярной биологии, основанных на проведении соответствующих генетических модификаций, представляют собой саму сущность метаболической инженерии ...» [1]. Для количественной характеристики внутриклеточных потоков микроорганизмов, растительных и животных клеток широко применим метод анализа метаболических потоков с использованием  $^{13}\text{C}$  изотопов ( $^{13}\text{C}$ -Metabolic Flux Analysis,  $^{13}\text{C}$ -MFA), который был разработан в последние два десятилетия. В основе метода  $^{13}\text{C}$ -MFA лежит объединение экспериментальных данных, сети биохимических реакций и приемов математического моделирования для определения внутриклеточных потоков *in vivo*, которые не могут быть измерены непосредственно.

С другой стороны, целенаправленное перераспределение потоков в разветвленных метаболических путях играет важную практическую роль в прикладной микробиологии и биотехнологии, когда высокоэффективный синтез желаемого вещества приводит к ухудшению роста или снижению активности штамма-продуцента. Переключение потоков может осуществляться, в частности, за счет метаболически индуцируемой транскрипции генов рекомбинантных путей [2, 3] или за счет регулируемого подавления экспрессии ключевого гена/генов, обусловленного встречной нетерминируемой транскрипцией [4].

Для целенаправленного редактирования генома в настоящее время используется разнообразный инструментарий, основанный на рекомбинации (Recombineering - recombination-mediated genetic engineering) и применяющийся совместно с CRISPR/Cas9 обусловленной системой контр-селекции.

В настоящей работе было продемонстрировано, что модификация хромосомы штамма *E. coli* MG1655

путем интегрирования ИПТГ-индуцируемых промоторов для регулируемого подавления экспрессии гена *pgi*, кодирующего ключевой фермент верхней части центрального метаболизма углерода *E. coli* – фосфоглюкоизомеразу, приводит к постепенному снижению активности фосфоглюкоизомеразы в зависимости от степени подавления экспрессии *pgi* гена. В результате поток углерода перераспределяется из пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса в сторону окислительной ветки Пентозофосфатного пути с медленной активацией пути Энтнера-Дудорова. При этом распределение потоков углерода в нижней части метаболизма практически не меняется. <sup>13</sup>C-MFA был осуществлен с использованием 100% [1,2-<sup>13</sup>C]-меченой глюкозы в качестве субстрата при выращивании клеток и ГХ-МС опосредованном измерением меченности протеиногенных аминокислот, а также сахаров, входящих в состав гликогена и РНК. В качестве основы для формулирования базовой модели метаболизма *E. coli* была использована опубликованная ранее консенсусная модель [5], модель «Antoniewicz-Palsson», в которой, в частности, реакции пентозофосфатного пути (ПФП), катализируемые транскетолозой и трансальдолазой, моделируются как метаболит-специфические, обратимые полу-реакции, ТК-С2 и ТА-С3 [6], одним из субстратов или продуктов которых являются С2 или С3 фрагменты соответствующих метаболитов. Все вычислительные процедуры <sup>13</sup>C-MFA проводились с помощью программы OpenFLUX2 [7], использующей концепцию разложения на элементарные метаболические единицы (Elementary Metabolic Units, EMU-разложение) для моделирование распространения <sup>13</sup>C изотопов по разветвленной метаболической сети [8]. Внутриклеточные потоки были найдены в результате минимизации взвешенной суммы квадратов отклонений между экспериментально измеренными и предсказанными из модели значениями внеклеточных потоков и меченности протеиногенных аминокислот и сахаров нелинейным методом наименьших квадратов. Для расчета доверительных интервалов на основе алгоритма параметрического бутстрепа [9] был использован метод процентилей [10]. Среди реализованных в программе OpenFLUX2 методов Монте-Карло для расчета доверительных интервалов данный подход упоминается ранее как метод «отбрасывания» [7].

В ранее проведенных исследованиях *Drgi* мутанта *E. coli* снижение скорости роста и поглощения глюкозы мутантными клетками связывали, прежде всего, с избыточным синтезом НАДФН за счет значительного усиления потока через оксидативную ветку ПФП и лишь как второстепенный фактор рассматривали возможную недостаточную способность ферментов ПФП катаболизировать глюкозу [11]. В настоящей работе, сравнивая потребление НАДФН для производства биомассы и синтез НАДФН в известных реакциях потоки, в которых были количественно определены методом <sup>13</sup>C-MFA, было показано, что именно «неэффективная» работа ферментов ПФП приводит к снижению роста в штамме, характеризующемся 6% остаточной активности фосфоглюкоизомеразы и отсутствием сверхпродукции НАДФН.

#### Литература:

- Stephanopoulos G. N., Aristidou A. A., and Nielsen J. H. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. San Diego: Academic Press, 1998. – С. 725.
- Farmer W. R., Liao J.C. Improving lycopene production in *Escherichia coli* by engineering metabolic control//*Nat. Biotechnol.* 2000. Vol. 18. № 5. P. 533-537.
- Doroshenko V. G., Tsyrenzhapova I. S., Krylov A. A., Kiseleva E. M., Ermishev V. Y., Kazakova S. M., Biryukova I. V., Mashko S. V. *Pho regulon promoter-mediated transcription of the key pathway gene aroGFbr improves the performance of an L-phenylalanine-producing Escherichia coli strain*//*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 88. № 6. P. 1287-1295.
- Krylov A. A., Airich L. G., Kiseleva E. M., Minaeva N. I., Biryukova I. V., Mashko S. V. Conditional silencing of the *Escherichia coli* *pykF* gene results from artificial convergent transcription protected from Rho-dependent termination//*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 18. № 1. P. 1-13.
- Long C. P., Gonzalez J. E., Feist A. M., Palsson B. O., Antoniewicz M. R. Dissecting the genetic and metabolic mechanisms of adaptation to the knockout of a major metabolic enzyme in *Escherichia coli*//*PNAS*. 2018. Vol. 115. № 1. P. 222-227.
- Kleijn R. J., van Winden W. A., van Gulik W. M., Heijnen J. J. Revisiting the <sup>13</sup>C-label distribution of the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway based upon kinetic and genetic evidence//*FEBS J.* 2005. Vol. 272. № 19. P. 4970-4982.
- Shupletsov M. S., Golubeva L. I., Rubina S. S., Podvyaznikov D. A., Iwatani S., Mashko S. V. OpenFLUX2: (<sup>13</sup>C)-MFA modeling software package adjusted for the comprehensive analysis of single and parallel labeling experiments//*Microb. Cell Fact.* 2014. Vol. 19. P. 152-177.
- Antoniewicz M. R., Kelleher J. K., Stephanopoulos G. Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions//*Metab. Eng.* 2007. Vol. 9. № 1. P. 68-86.
- Theorell A., Leweke S., Wiechert W., Nöh K. To be certain about the uncertainty: Bayesian statistics for <sup>13</sup>C metabolic flux analysis//*Biotechnol. Bioeng.* 2017. Vol. 114. № 11. P. 2668-2684.
- DiCiccio T. J., Romano J. P. Discussion: Theoretical Comparison of Bootstrap Confidence Intervals//*Ann. Statist.* 1988. Vol. 16. № 3. P. 965-969.
- Canonaco F., Hess T. A., Heri S., Wang T., Szyperski T., Sauer U. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase *UdhA*//*FEMS Microbiol. Lett.* 2001. Vol. 204. № 2. P. 247-252.

UDK 577.121:51-76

## RATIONAL DESIGN BASED ON GENOME EDITING THROUGH THE TARGETED CARBON FLUX REARRANGEMENT FOR ACHIEVEMENT THE AIMS OF METABOLIC ENGINEERING

Golubeva L. I., Krylov A. A., Mashko S. V.

*Closed joint-stock company "Ajinomoto-Genetika research institute", Moscow, Russia  
 117545, Moscow, 1st Dorozhny pr., 1-1  
 e-mail: luba\_golubeva@agri.ru*

Using <sup>13</sup>C-MFA approach the carbon flux redistribution in *E. coli* cells resulted from the *pgi*-gene silencing provided by convergent non-terminated transcription has been investigated. The perspectives to combine the target bacterial genome editing techniques with the methods of the intracellular flux analysis for the aims of metabolic engineering are discussed.

**Key words:** metabolic flux analysis, convergent non-terminated transcription, target chromosome editing, NADPH balance.

It is well-established that "The combination of analytical methods to quantify fluxes and their control with molecular biological techniques to implement suggested genetic modifications is the essence of metabolic engineering" [1]. As for quantification of intracellular metabolic fluxes in microorganisms, plant and mammalian cell, a steady-state <sup>13</sup>C-based metabolic flux analysis (<sup>13</sup>C-MFA) was formed in the two last decades. <sup>13</sup>C-MFA integrates experimental data with biochemical networks and mathematical modeling to 'measure' the in vivo fluxes within an organism that are not directly observable.

On the other hand, the targeted redistribution of metabolic fluxes into branched pathways is extremely important for applied microbiology and biotechnology when efficient biosynthesis of a desired product leads to growth retardation and decreased activity of producing strain. This switching could be based, in particular, on metabolically inducible transcription of recombinant pathway genes [2, 3] or on conditional silencing of key gene(s), e.g., due to its convergent non-terminated transcription [4].

At present a broad range of Recombineering-based genetic tools can be used for targeted genome editing, usually in combination with CRISPR/Cas9-mediated technique for contra-selection.

In the present study, it was demonstrated that precise modification of the *E. coli* MG1655 chromosome due to insertion of the IPTG-regulated convergent promoters for inducible conditional silencing of the *pgi*-gene from *E. coli* upper part of the carbon central metabolism resulted in gradual decreasing of the PGI activity in dependence on efficiency of conditional silencing that, in turn, led to carbon flux redistribution in glycolysis from Embden-Meyerhof-Parnas pathway into the oxidative branch of pentose phosphate pathway (PPP) with slow activation of Entner-Doudoroff pathway and without significant changes in the bottom part of metabolism. Comprehensive <sup>13</sup>C-MFA was performed using 100% [1,2-<sup>13</sup>C]-glucose in the carbon labeling experiment, GC-MS analysis of proteinogenic amino acids and measuring glycogen and RNA labeling. As the *E. coli* core metabolic model the slightly modified consensus – "Antoniewicz-Palsson" model [5] was used with TK- and TA-catalyzed reactions of the PPP modeled according to [6] as metabolite-specific, reversible, C2 and C3 fragments producing and consuming half-reactions TK-C2 and TA-C3. <sup>13</sup>C-MFA calculations were performed using the OpenFLUX2 software [7], which is based on the elementary metabolite units (EMU) framework [8]. Intracellular fluxes were estimated by minimizing the variance-weighted sum of squared residuals (SSR) between the measured and model predicted extracellular fluxes and GC-MS-detected mass-isotopomer distributions, using non-linear least-squares regression. Parametric bootstrap confidence intervals (PB-CIs) [9] were calculated by percentile method [10] realized in OpenFLUX2 and earlier mentioned as "discarding" method of Monte Carlo stimulation [7].

Earlier provided investigations of *E. coli* Δ*pgi* mutant indicated growth retardation and decreased glucose consumption rate that was explained mainly by toxicity of NADPH overproduction in enhanced flux through PPP, and maybe only as additional factor – by restricted capacity of PPP enzymes for of glucose catabolism [11]. Now, it was apparently demonstrated due to comparison between the NADPH biosynthetic requirements and NADPH production in the estimated internal fluxes, that namely the "weakness" of the PPP enzymes resulted in growth rate retardation even by the strain with 6% of wt PGI activity when oversynthesis of NADPH was not still occurred.

References:

1. Stephanopoulos G. N., Aristidou A. A., and Nielsen J. H. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. San Diego: Academic Press, 1998. – C. 725.
2. Farmer W. R., Liao J.C. *Improving lycopene production in Escherichia coli by engineering metabolic control*//*Nat. Biotechnol.* 2000. Vol. 18. № 5. P. 533-537.
3. Doroshenko V. G., Tsyrenzhapova I. S., Krylov A. A., Kiseleva E. M., Ermishev V. Y., Kazakova S. M., Biryukova I. V., Mashko S. V. *Pho regulon promoter-mediated transcription of the key pathway gene aroGFbr improves the performance of an L-phenylalanine-producing Escherichia coli strain*//*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 88. № 6. P. 1287-1295.
4. Krylov A. A., Airich L. G., Kiseleva E. M., Minaeva N. I., Biryukova I. V., Mashko S. V. *Conditional silencing of the Escherichia coli pykF gene results from artificial convergent transcription protected from Rho-dependent termination*//*J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 18. № 1. P. 1-13.
5. Long C. P., Gonzalez J. E., Feist A. M., Palsson B. O., Antoniewicz M. R. *Dissecting the genetic and metabolic mechanisms of adaptation to the knockout of a major metabolic enzyme in Escherichia coli*//*PNAS.* 2018. Vol. 115. № 1. P. 222-227.
6. Kleijn R. J., van Winden W. A., van Gulik W. M., Heijnen J. J. *Revisiting the <sup>13</sup>C-label distribution of the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway based upon kinetic and genetic evidence*//*FEBS J.* 2005. Vol. 272. № 19. P. 4970-4982.
7. Shupletsov M. S., Golubeva L. I., Rubina S. S., Podvyaznikov D. A., Iwatani S., Mashko S. V. *OpenFLUX2: (<sup>13</sup>C)-MFA modeling software package adjusted for the comprehensive analysis of single and parallel labeling experiments*//*Microb. Cell Fact.* 2014. Vol. 19. P. 152-177.
8. Antoniewicz M. R., Kelleher J. K., Stephanopoulos G. *Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions*//*Metab. Eng.* 2007. Vol. 9. № 1. P. 68-86.
9. Theorell A., Leweke S., Wiechert W., Nöh K. *To be certain about the uncertainty: Bayesian statistics for <sup>13</sup>C metabolic flux analysis*//*Biotechnol. Bioeng.* 2017. Vol. 114. № 11. P. 2668-2684.
10. DiCiccio T. J., Romano J. P. *Discussion: Theoretical Comparison of Bootstrap Confidence Intervals*//*Ann. Statist.* 1988. Vol. 16. № 3. P. 965-969.
11. Canonaco F., Hess T. A., Heri S., Wang T., Szyperski T., Sauer U. *Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in Escherichia coli and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA*//*FEMS Microbiol. Lett.* 2001. Vol. 204. № 2. P. 247-252.

УДК 575.112:004

## НЕОНАТАЛЬНАЯ НЕПЕРЕНОСИМОСТЬ ЛАКТОЗЫ ВЫЗЫВАЕТ ДОЛГОВРЕМЕННУЮ ФЕТАЛИЗАЦИЮ ФЕНОТИПА И ТРАНСКРИПТОМА КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС

**Анацкая О. В., Рунов А. Л., Пономарцев С.В., Густайнис К. Р., Толкунова Е. Н, Харченко М. В., Гринчук Т.Н., Матвеев И. В., Вонский М. С., Казаченко А. А., Шахнович П. Г., Борхсениус С. Н. Коростин Д., Елмуратов А., Ильинский В., Красненко А., Ким А., Цыганов О. В, Цыганов В. Г., Томилин А. Н., Никольский Н. Н., Виноградов А. Е.**

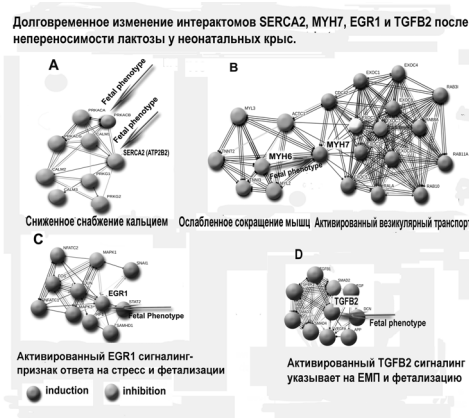
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия. 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр, д. 4.  
e-mail: olga.anatskaya@gmail.com

Причиной гипертонии могут быть воспаления в детстве. Непереносимость лактозы (НЛ) - частая причина воспалений у детей. Изучение последствий НЛ для сердца неонатальных крыс выявило долговременное изменение ЭКГ и ДНК нестабильность в кардиомиоцитах (К). Анализ транскриптома и РТ-ПЦР показали активацию маркеров фетальности, что подтверждает роль НП в патогенезе заболеваний сердца.

**Ключевые слова:** непереносимость лактозы, ремоделирование кардиомиоцитов, полиплоидия, ДНК нестабильность, долговременный эффект

Долговременные эпидемиологические исследования показали, что воспалительные процессы в во время активного роста повышают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний и гипертонии у взрослых людей. Это явление было названо онтогенетическим программированием (ОП). Патофизиологические механизмы ОП пока не ясны. Данные медицинской статистики свидетельствуют о том, что наиболее частой причиной воспалений у детей является гастроэнтерит. Недавно было показано, что неонатальный криптоспориозный гастроэнтерит ассоциирован с необратимым повышением плоидности кардиомиоцитов, которая может менять активность транскриптома (Anatskaya, et al., 2010; Vazquez-Martin, et al 2016). В настоящей работе мы изучили отложенное влияние неонатального гастроэнтерита, вызванного непереносимостью лактозы (НЛ), для структуры и функции сердца крыс. НЛ вызывали перегрузкой фермента лактазы у 10 дневных животных.

Заболевание поддерживали в течение 10 дней. Поскольку у подсосных животных активность лактазы высока (по крайней мере до 14 дня после рождения), индуцированный гастроэнтерит проявлялся лишь во вздутии живота и в 15-17%-ной потере массы тела. Тем не менее, признаки дисфункции и ремоделирования сердца сохранялись по крайней мере еще 3 месяца после выздоровления. Результаты электрокардиографии выявили укорочение Q-T пиков и учащение пульса, что указывает на повышенный риск развития аритмии. Результаты анализа изображений и цитометрии кардиомиоцитов апикальной части левого желудочка выявили атрофию и ремоделирование формы клеток, а также увеличение пloidности и признаки геномной нестабильности в виде многочисленных мостов, микроядер и амитотических фигур. Оценка экспрессии стресс индуцируемых маркеров фетальности (MYH7, EGR1 и TGFB2) и маркеров мышечной дифференцировки (MYH7 и SERCA2) методом ПЦР в реальном времени выявила индукцию фетальных маркеров и подавление маркеров дифференцировки. Чтобы дополнительно верифицировать данные и лучше понять причину изменений в сердце, мы провели полнотранскриптомное секвенирование фрагментов апикальной части левого желудочка и оценили активность интерактонов всех маркеров (Рис.). Признаки фетализации были видны по переключению тяжелой цепи миозина с быстрой изоформы на медленную, а также по подавлению сократительной функции и активации секреторной функции. Также, к признакам фетальности можно отнести активацию интерактома TGFB2 и подавление и интерактома кальциевой АТФазы SERCA2.



В целом, полученные данные показали, что неонатальная непереносимость лактозы активирует ответ на стресс, способствует возврату кардиомиоцитов к фетальному фенотипу, что снижает их сократительную функцию.

Авторы признательны за финансовую поддержку фонду РНФ №14-50-00068 и РФФИ.

#### Литература:

- Vazquez-Martin A., Anatskaya O.V., Giuliani A., Erenpreisa J., Huang S., Salmina K., Inashkina I., Huna A., Nikolsky N.N., Vinogradov A.E. Somatic polyploidy is associated with the upregulation of c-MYC interacting genes and EMT-like signature//Oncotarget. 2016. Vol. 7. № 46. P. 75235-75260
- Anatskaya O. V., Sidorenko N. V., Beyer T. V., Vinogradov A. E. Neonatal cardiomyocyte ploidy reveals critical windows of heart development //Int. J. Cardiol. 2010. Vol. 141. № 1. P. 81-91.

УДК 575.112:004

## NEONATAL LACTOSE INTOLERANCE TRIGGERS LONG-TERM PHENOTYPE AND TRANSCRIPTOME FETALIZATION IN RAT CARDIOMYOCYTE

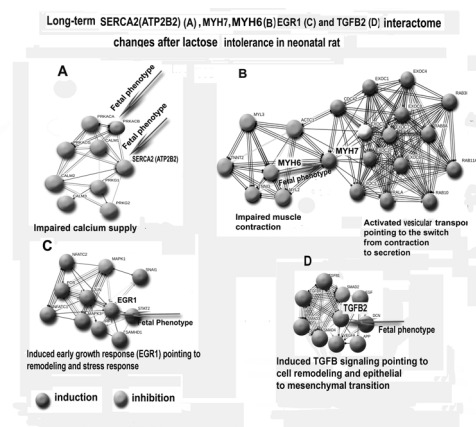
Anatskaya O.V., Runov A.L., Ponomartsev S.V., Gustainis K.R., Tolkunova E.N., Kharchenko M.V., Grinchuk T.N., Matveev I. V., Vonsky M. S., Kazachenko A. A., Shakhnovitch P. G., Borkhsenius S. N., Korostin D., Elmuratov A., Il'insky V., Krasnenko A., Kim A., Tsyganov O.V., Tsyganov V.G., Tomilin A.N., Nikolsky N. N., Vinogradov A. E.

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia, 194064, Saint-Petersburg, Tikhoretsky ave, 4.  
 e-mail: olga.anatskaya@gmail.com

Hypertension in adults may originate from inflammation (I) in neonatal life. Since lactose intolerance (LI) is a common cause of I in children, we studied postponed effects of neonatal LI on adult rat heart. Our data indicated that the disease causes EKG change and cardiomyocyte genome instability. Transcriptome analysis revealed features of heart fetalization and contraction dysfunction confirming that neonatal LI may be a pathogenic factor of adult heart diseases.

**Key words:** lactose intolerance, cardiomyocyte remodelong, polyploidy, DNA instability, long-term effect.

Longitudinal epidemiological studies and extensive experimental data suggest that growth retardation, malnutrition and inflammation in early postnatal development increase risks of cardiovascular diseases and hypertension in later life (Hanson, Gluckman 2014; Shaoul, et al., 2016). This phenomenon was termed as developmental programming (DP) (Barker, 2002). Pathophysiological triggers and underlying mechanisms of DP are still poorly understood (Dasinger, et al., 2016). Medical statistics indicates that the most common cause of inflammation and growth impairment in young children is gastroenteritis (Finch, Crimmins, 2004). Our previous data indicated that neonatal cryptosporidial gastroenteritis is associated with long-term cardiomyocyte hyperpolyploidy that may alter gene expression landscape (Anatskaya, et al., 2010; Vazquez-Martin, et al., 2016). Here we investigated long-term effects of neonatal lactose intolerance (LI) on cardiac structure and cardiomyocyte morphology and function. LI was challenged by enzyme lactase overloading in 10 days old neonatal rat puppies. The diseases was maintained during 10 days. Since lactase activity is high neonatal puppies (at least until the 14-day after birth), lactose intolerance did not challenge severe gastroenteritis. The disease manifested in moderate weight loss (by 15-17%) and in a slight stomach bubbling. Nevertheless, heart remodeling and dysfunction were visible at least three month after recovery from the disease. The data of electrocardiography indicated that compared to health control, the experimental animals had Q-T interval shortening and altered pulse rate suggesting the increased risk of arrhythmia development. Image analysis and left ventricle cardiomyocyte cytometry revealed cell atrophy, elongation, increased ploidy and genome instability seen from multiple bridges, micronuclei and amitotic figures. The evaluation of the expression of fetal markers (MYH7, EGR1, TGFB2) and markers of differentiation (MYH6 and SERCA2) by RT PCR identified the switch from fetal to differentiation. To verify the data of RT-PCR and to better understand the nature of the observed changes, we performed mRNA sequencing of the left ventricle apex fragments and assessed interactome activity of these markers (Fig.). The activation of fetal program was seen from the substitution of myosin heavy chain fast (MYH6) with myosin heavy chain slow (MYH7), from the inhibition of muscle contraction genes and from the induction of genes related to vesicular transport. Also fetal features included the induction of TGFB2 interactome and the inhibition of calcium ATPase SERCA2 interactome.



Overall, these results suggest that neonatal lactose intolerance triggers long-term and coordinated stress response including the return to fetal gene program associated with progressive heart function decline.

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation №14-50-00068 and RFBR

*References:*

Anatskaia O. V., Sidorenko N. V., Beier T. V., Vinogradov A. E. Neonatal gastroenteritis triggers long-term cardiomyocyte atrophy, remodeling and irreversible hyperpolyploidization// *Kardiologiya*. 2010. Vol. 50. № 12. P. 35-44.

Vazquez-Martin A., Anatskaya O.V., Giuliani A., Erenpreisa J., Huang S., Salmina K., Inashkina I., Huna A., Nikolsky N.N., Vinogradov A.E. Somatic polyploidy is associated with the upregulation of c-MYC interacting genes and EMT-like signature//*Oncotarget*. 2016. Vol. 7. № 46. P. 75235-75260.



УДК: 577.2 ББК: 2

## НОВЫЙ ФЕРМЕНТ ДНК-ПОЛИМЕРАЗА И ПРАЙМАЗА PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА: ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ЭКСПРЕССИИ, ТЕСТИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ IN VITRO

А.В.Макарова<sup>1</sup>, Е.О.Болдинова<sup>1</sup>, Р.Хайруллин<sup>2</sup>, С.Горазд<sup>3</sup>, Ш.Ванрой<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Россия, 123182, Москва, площадь академика Курчатова, 2, amakarova-img@yandex.ru, +7-916-513-54-54

<sup>2</sup> Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета, Россия, 420012, Казань, Карла Маркса, 18

<sup>3</sup> Факультет медицинский биохимии и биофизики Университета Умеа, Швеция, Умеа

PrimPol – недавно описанная ДНК полимеразы с ДНК-праймазной активностью. Мы получили продуценты PrimPol в клетках бактерий, дрожжей и культуре клеток человека, провели анализ каталитической активности PrimPol и ее стабильности в разных условиях, исследовали активность PrimPol на ДНК-матрицах разной структуры. Показано стимулирующее влияние ядерного белка PolDIP2 на активность PrimPol человека.

**Ключевые слова:** праймаза-полимераза, синтез ДНК, продуцент

В 2013 году тремя группами ученых из разных стран был описан новый фермент репликации у человека – ДНК-полимераза и праймаза PrimPol [1–3]. Ортологи PrimPol обнаружены также у архей и многих эукариотических организмов. В отличие от комплекса Pol alpha-праймаза PrimPol инициирует репликацию ДНК, включая дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP). В клетке PrimPol реинициирует репликацию ДНК, вызванную разными факторами: повреждениями ДНК, недостатком dNTP субстратов, неканоническими ДНК-структурами (например, G-квадруплексами) и терминаторами репликации [4]. PrimPol не только инициирует синтез ДНК de novo после поврежденных участков ДНК, но и обладает способностью включать dNTPs напротив ряда повреждений ДНК [4]. Уникальные свойства фермента уже нашли применение в высокоэффективной полногеномной амплификации (в том числе амплификации генома одной клетки) и создании библиотек кДНК [5, 6]. Кроме того, PrimPol является потенциальной мишенью для создания препаратов, повышающих эффективность химиотерапии, и может найти применение при амплификации поврежденных молекул ДНК в криминалистике, антропологии и археологии. Активность PrimPol человека in vitro высока и варьирует в экспериментах разных научных групп. Получение новых продуцентов PrimPol и оптимизация методов очистки и тестирования активности PrimPol является актуальной биотехнологической задачей.

Нами были получены продуценты рекомбинантной PrimPol в разных штаммах *E. coli* впервые – в клетках эукариот. Очистку ферментов, слитых с GST- или FLAG- тагами, проводили с помощью аффинной хроматографии. Было показано, что клетки *E. coli* суспензионная культура клеток человека FreeStyle HEK293 позволяют получать высокий выход белка (> 1 мг с литра культуры), тогда как для продуцента PrimPol в клетках дрожжей *S. cerevisiae* характерен очень низкий выход белка. Препараты PrimPol человека, выделенные из *E. coli* культуры клеток человека, обладают одинаковым уровнем активности. Максимальная ДНК-полимеразная активность PrimPol наблюдается при pH 6.0, 0 – 50 mM NaCl и 10 mM MgCl<sub>2</sub> или 3 mM MnCl<sub>2</sub> в качестве Me<sup>2+</sup> кофакторов. Нами также был проведен анализ стабильности активности PrimPol при многократных циклах замораживания-оттаивания, температурных и механических воздействиях.

На втором этапе было проведено исследование способности PrimPol к репликации напротив ряда биологически значимых повреждений ДНК: 8-охо-G, тимидин гликоля, апуриновых/апиримидиновых сайтов, Об-me-G, этено-A и других повреждений. Показано, что с наибольшей эффективностью и точностью PrimPol осуществляет репликацию напротив 8-охо-G, тогда как этено-A полностью блокирует ДНК-полимеразную активность фермента. Исследование функционального взаимодействия PrimPol с митохондриальной и ядерной формами белка polymerase delta-interacting protein 2 (PolDIP2) показало, что ядерная, но не митохондриальная изоформа PolDIP2 в значительной степени стимулирует (> 10–20 раз) каталитическую активность PrimPol in vitro. Таким образом, PolDIP2 может являться важным регуляторным фактором PrimPol при репликации геномной ДНК.

Полученные результаты могут найти применение в развитии новых биотехнологий с использованием PrimPol.

Литература:

1. Bianchi J., Rudd S. G., Jozwiakowski S. K., Bailey L. J., Soura V., Taylor E., et al. PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication//Mol Cell. 2013. Vol. 52. №. 4. P. 566-573. 2. García-Gómez S., Reyes A., Martínez-Jiménez M.I., Chocrón E.S., Mourón S., Terrados G., et al. PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells// Mol Cell. 2013. Vol. 52. №. 4. P. 541–553. 3. Wan L., Lou J., Xia Y., Su B., Liu T., Cui J., et al. hPrimpol1/CCDC111 is a human DNA primase-polymerase required for the maintenance of genome integrity// EMBO Rep. 2013. Vol. 14. P. 1104-1112. 4. Boldinova E. O., Wanrooij P. H., Shil0kin E. S., Wanrooij S., Makarova A. V. DNA Damage Tolerance by Eukaryotic DNA Polymerase and Primase PrimPol//Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol. 18. №. 7. P. E1584. 5. Agudo R., Calvo P. A., Martínez-Jiménez M. I., Blanco L. Engineering human PrimPol into an efficient RNA-dependent-DNA primase/polymerase//Nucleic Acids Res. 2017. Vol. 45. № 15. 9046-9058. 6. Picher Á. J., Budeus B., Wafzig O., Krüger C., García-Gómez S., Martínez-Jiménez M. I., Díaz-Talavera A., Weber D., Blanco L., Schneider A. TruePrime is a novel method for whole-genome amplification from single cells based on TthPrimPol//Nat. Commun. 2016. Vol. 7. P. 13296.

**Финансирование:** Работа поддержана грантами Президиума РАН «МКБ. Новые группы» и РФФИ 15-04-08398-а.

UDC 577.2 BBK 2

## NEW HUMAN DNA POLYMERASE AND PRIMASE PRIMPOL: OPTIMIZATION OF EXPRESSION, ACTIVITY TESTING AND CHARACTERIZATION OF PROPERTIES IN VITRO.

**A.Makarova<sup>1</sup>, E.Boldinova<sup>1</sup>, R.Khairullin<sup>2</sup>, G.Stojković<sup>3</sup>, S.Wanrooij<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Molecular Genetics of Russian Academy of Sciences, Russia, 123182, Moscow, Kurchatov sq, 2

<sup>2</sup> Institute of Fundamental Medicine and Biology of Kazan Federal University, Russia, 420012, Kazan, K.Marx, 18

<sup>3</sup> Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Umeå University, Sweden, , Umea

PrimPol is a recently described DNA polymerase which possesses also the DNA primase activity. We obtained PrimPol producers in bacteria, yeast and human cell culture, analyzed the catalytic activity and stability of PrimPol under different conditions as well as studied the DNA polymerase activity of PrimPol on DNA templates with different structures. The stimulating effect of the nuclear PolDIP2 protein on the catalytic activity of human PrimPol was also shown.

**Key words:** primase-polymerase, DNA synthesis, producer

In 2013, three groups of researchers from different countries described a new human replication enzyme – DNA polymerase and primase PrimPol [1-3]. PrimPol orthologs were found in archaea and many eukaryotic organisms. In contrast to the Pol alpha-primase complex, PrimPol initiates DNA replication with deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP). In cells PrimPol reinitiates DNA replication stalled by various factors: DNA damage, lack of dNTP substrates, noncanonical DNA structures (for example, G-quadruplexes) and chain terminators [4]. PrimPol not only initiates DNA synthesis de novo after DNA damage, but also incorporates dNTPs opposite of a number of DNA lesions [4]. The unique properties of the enzyme have already found application in highly efficient full-genomic amplification (including amplification of the single-cell genome) and the creation of cDNA libraries [5, 6]. Moreover, PrimPol is a potential target for anticancer drugs that increase the effectiveness of chemotherapy. PrimPol can also find application in the amplification of damaged DNA molecules in criminalistics, anthropology and archeology. The activity of human PrimPol in vitro is relatively weak and it varies in the experiments of different scientific groups. New PrimPol producers and methods for purification and testing of PrimPol activity is of high scientific interest.

We have obtained producers of recombinant PrimPol in different strains of E. coli and, for the first time, – in eukaryotic cells. Purification of the enzymes fused to GST or FLAG tags was performed by affinity chromatography. It was shown that E. coli cells and suspension culture of human cells FreeStyle HEK293 allow obtaining high yield of protein (> 1 mg from a liter of culture), whereas the yield of PrimPol from yeast S. cerevisiae cells is very low. PrimPol preparations purified from E. coli and human cell cultures possess the same level of activity. The maximum of the DNA polymerase activity of PrimPol is observed at pH 6.0, 0-50 mM NaCl and 10 mM MgCl<sub>2</sub> or 3 mM MnCl<sub>2</sub> as Me<sup>2+</sup> cofactors. We also carried out an analysis of the PrimPol stability under multiple freeze-thaw cycles, thermal and mechanical effects.

At the second stage, the ability of PrimPol to carry out DNA translesion synthesis on DNA templates with different biologically significant DNA lesions was investigated: 8-oxo-G, thymidine glycol, apurinic / apyrimidine sites, O<sub>6</sub>-me-G, etheno-A and other lesions. It is shown that PrimPol replicates opposite 8-oxo-G with the greatest efficiency and accuracy, while etheno-A completely blocks the DNA polymerase activity of the enzyme. The study of the functional

interaction of PrimPol with the mitochondrial and nuclear forms of the protein polymerase delta-interacting protein 2 (PoDIP2) showed that the nuclear but not mitochondrial isoform of PoDIP2 significantly stimulates (> 10-20 times) the catalytic activity of PrimPol in vitro. Thus, PoDIP2 can be an important regulating factor of PrimPol required for the efficient replication of genomic DNA.

These results can find application in the development of new techniques in biotechnology which involve PrimPol.

References:

1. Bianchi J., Rudd S. G., Jozwiakowski S. K., Bailey L. J., Soura V., Taylor E., et al. PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication//Mol Cell. 2013. Vol. 52. №. 4. P. 566-573. 2. García-Gómez S., Reyes A., Martínez-Jiménez M.I., Chocrón E.S., Mourón S., Terrados G., et al. PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells// Mol Cell. 2013. Vol. 52. №. 4. P. 541–553. 3. Wan L., Lou J., Xia Y., Su B., Liu T., Cui J., et al. hPrimpol1/CCDC111 is a human DNA primase-polymerase required for the maintenance of genome integrity//EMBO Rep. 2013. Vol. 14. P. 1104-1112. 4. Boldinova E. O., Wanrooij P. H., Shilkin E. S., Wanrooij S., Makarova A. V. DNA Damage Tolerance by Eukaryotic DNA Polymerase and Primase PrimPol//Int. J. Mol. Sci. 2017. Vol. 18. №. 7. P. E1584. 5. Agudo R., Calvo P. A., Martínez-Jiménez M. I., Blanco L. Engineering human PrimPol into an efficient RNA-dependent-DNA primase/polymerase//Nucleic Acids Res. 2017. Vol. 45. №. 15. P. 9046-9058. 6. Picher Á. J., Budeus B., Wafzig O., Krüger C., García-Gómez S., Martínez-Jiménez M. I., Díaz-Talavera A., Weber D., Blanco L., Schneider A. TruePrime is a novel method for whole-genome amplification from single cells based on TthPrimPol//Nat. Commun. 2016. Vol. 7. P. 13296.

**Grant:** The work is supported by grants of the Presidium of the RAS “Molecular and Cellular Biology. New groups” and RFBR 15-04-08398-a.

УДК 575.112:004

## ОТСУТСТВИЕ ТУМОРОГЕННОСТИ У МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТЬЮ, ВЫЗВАННОЙ СУБЛЕТАЛЬНЫМ ТЕПЛОВЫМ ШОКОМ.

**Анацкая О.В., Шилина М.А., Виноградов А.Е., Алексеенко Л.Л., Кожухарова И.В. Пуговкина Н.А., Фридлянская И.И., Гринчук Т.М. Никольский Н.Н.**

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия. 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр, д. 8.  
e-mail: olga.anatskaya@gmail.com

Целью работы было исследовать опухолеобразующий потенциал МСК эндометрия человека с генетической нестабильностью, вызванной сублетальным тепловым шоком (СТШ). Оценка признаков трансформации Ханахана – Вайнберга в транскриптоме клеток показала отсутствие, что предполагает существование особенной системы защиты от трансформации.

**Ключевые слова:** МСК эндометрия человека, генетическая нестабильность критерии трансформации.

Мезенхимные стволовые клетки эндометрия (эмСК) человека обладают высоким противовоспалительным и васкулогенным потенциалом. Эти уникальные свойства связаны с их способностью обеспечивать быстрый рост эндометрия. В настоящее время культивируемые эмСК успешно применяют в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. В тоже время, культивирование усиливает генетическую нестабильность, которая может способствовать малигнизации клеток. Целью работы было исследовать опухолеобразующий потенциал эмСК с генетической нестабильностью, вызванной сублетальным тепловым шоком (СТШ). Генетическая нестабильность и опухолеобразующая способность были оценены на 6 пассаже после СТШ методом классического кариотипирования и секвенирования мРНК. Кариотипирование выявило хромосомные перестройки и анеуплоидию. мРНК секвенирование показало что СТШ вызывает долговременную активацию транскриптома. Оценка признаков трансформации Ханахана – Вайнберга (Hanahan-Weinberg, 2011) показала их отсутствие. Это предполагает, что СТШ-пережившие клетки противостоят трансформации. Детальное исследование функционального распределения генных модулей с разной активностью между интактными и экспериментальными клетками обнаружило три линии защиты от трансформации. Первую линию обеспечивает отсутствие экспрессии онкогенов MYC и AKT1 (PKB) и теломеразы hTERT. Вторая линия основана на способности эмСК снижать активность множества про- онкогенных путей в ответ на повреждение ДНК и анеуплоидию. Третью линию поддерживает координированная индукция противоопухолевых путей, включая TP53, p21 (CDKN1A) и p16 (CDKN2A). В целом, наши данные показали, что, несмотря на генетическую нестабильность, СТШ-пережившие клетки не трансформируются, а подвергаются репликативному старению.

Финансирование исследования: грант РФФ № 14-50-00068.

UDC 575.112:004

## HUMAN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS WITH SUBLETHAL HEAT SHOCK INDUCED DNA INSTABILITY DO NOT SHOW HALLMARKS OF CANCER

Anatskaya O.V., Shilina M.A., Vinogradov A.E., Alekseenko L.L., Kozhoukharova I.V., Pougovkina N.A., Frydlyanskaya I.I., Grinchuk T.M., Nikolsky N.N.

Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia, 194064, Saint-Petersburg, Tikhoretsky ave, 4.  
e-mail: olga.anatskaya@gmail.com

The aim of the study was to investigate transformational potential of sublethal heat shock (SHS) induced genome instability in human eMSC. The evaluation of Hanahan-Weinberg hallmarks of cancer did not reveal features of transformation suggesting that eMSC possess particular system of protection against transformation.

**Ключевые слова:** human endometrium MSC, genetic instability, hallmarks of cancer

Human endometrial mesenchymal stem cells show high anti-inflammatory and vasculogenic potential. These valuable features are associated with a special role of eMSC in every month endometrium growth. Cultured eMSC are being applied in heart disease treatment and encouraging results have been reported. At the same time, cell cultivation increases genome instability that may promote malignisation. The aim of the study was to investigate transformational potential of sublethal heat shock (SHS) induced genome instability in human eMSC. Genetic changes and transformation potential were evaluated by the methods of classic karyotyping, mRNA sequencing and bioinformatic analysis. Classic karyotyping identified prominent genetic instability and aneuploidy. The results of transcriptome analysis confirmed high genetic instability that exerts global effect on transcriptome activity. The evaluation of Hanahan-Weinberg hallmarks of cancer (Hanahan-Weinberg, 2011) did not reveal features of transformation. This result implies that SHS survived eMSC possess particular defense against transformation. The investigation of functional distribution of gene modules demonstrating statistically significant difference of activity between intact and SHS survived cells revealed several lines of defense. The first line is provided by the ability of eMSC to switch off the expression of MYC, hTERT and AKT1 oncogenes. The second line is based on the ability to impair the activity of pro-oncogenic pathways in response to DNA damage and aneuploidy. The third line of defense is provided by the induction of tumor suppressive pathways including TP53, p21, p15 pathways and pathways of DNA excision repair. Overall, our data suggest that despite genetic instability, SHS-survived eMSC do not undergo transformation and entered replicative senescence after prolonged expansion in culture, confirming their mortality and oncological safety.

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation №14-50-00068

УДК 575.224.23

## ПЕРСПЕКТИВЫ КЛИНИЧЕСКОЙ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ЦИТОГЕНЕТИКИ В ЭРУ ГЕНОМНЫХ И ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Лебедев И.И.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томск, Россия  
634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10  
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Развитие технологий секвенирования генома и его адресного редактирования, наряду с методами репрограммирования клеток обеспечили уникальную основу для прорывных исследований в области цитогенетики человека, направленных на разработку новых подходов к классификации, изучению патогенеза и к диагностике хромосомных заболеваний.

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; микроделеционные и микродупликационные синдромы; редактирование кариотипа; хромосомные болезни; цитогенетика.

Технологический переход из геномной эры в постгеномную, сопровождающийся появлением новых высокопроизводительных методов анализа генома, его анотирования, редактирования и репрограммирования, обеспечил вступление клинической и фундаментальной цитогенетики в пятую фазу своего развития, обозначенную как «секвенирование хромосом» [1]. Взгляд на хромосому в контексте некоторой упорядоченной последовательности нуклеотидов, наряду с достижениями в изучении принципов организации, изменчивости и функционирования генома человека, дали возможность существенным образом переосмыслить представления о разнообразии и патогенезе особого класса наследственных болезней, обусловленных реорганизацией генетической информации на хромосомном уровне. Ключевым моментом, при этом, явилось изменение самого объекта цитогенетического анализа. Не отрицая исключительную ценность стандартного кариотипирования метафазных препаратов хромосом, остающегося до настоящего времени «золотым стандартом» в цитогенетике, многие прорывные достижения в этой дисциплине были сделаны или ожидаются на геномном, клеточном или даже тканевом уровне организации. В частности, выявление блоков сегментных дупликаций генома позволило сделать вывод о предопределенности aberrантных рекомбинационных событий, приводящих к закономерному возникновению микроструктурных aberrаций хромосом. Такие рекуррентные хромосомные перестройки лежат в основе формирования нового класса хромосомных болезней – синдромов реципрокных микроделеций и микродупликаций [2]. Таким образом, следует отметить, что технологии диагностики хромосомных нарушений трансформировались в технологии описания новых наследственных синдромов.

Следующим ключевым моментом явилось существенное увеличение уровня разрешения молекулярно-цитогенетического анализа, позволившее в пределе детектировать микроструктурные aberrации хромосом, затрагивающие изменения на уровне отдельного гена или даже его фрагментов. Как результат, появился еще один класс хромосомных болезней, представленный «моноклоновыми» микроделециями и микродупликациями хромосом [3]. Несмотря на кажущееся в этом случае стирание границ между моноклоновыми и хромосомными болезнями, последние, тем не менее, сохраняют свои особенности наследования и патогенеза.

Что же касается собственно вопросов патогенеза хромосомных болезней, то перспективы его изучения существенно зависят от прогресса в области клеточной биологии. Появление технологий получения клеток с индуцированной плюрипотентностью и методов их направленной клеточной дифференцировки позволили создавать *in vitro* модели интересующих исследователя типов хромосомных мутаций. Впервые появилась возможность изучения экспрессии генов в целевых типах аутологичных клеток от пациентов с уникальными хромосомными мутациями [4]. Наконец, биологические особенности сегрегации хромосом в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках впервые обозначили задачу «хромосомной терапии» болезней человека [5], не только выводя цитогенетику на новый уровень своего развития, но и обозначая новые горизонты развития для всей медицинской генетики и постгеномной медицины.

Исследование выполнено в рамках Соглашения о предоставлении субсидии от 23.10.2017 г. № 14.601.21.0015 между Министерством образования и науки Российской Федерации и Томским НИМЦ, на выполнение научно-исследовательской работы по теме: «Разработка прогноза реализации приоритета научно-технологического развития, определенного пунктом 20в «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)» Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации». Уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEF160117X0015. Идентификатор государственного контракта/контракта учреждения/договора (соглашения) 000000007417PE10002.

#### Литература:

1. Ferguson-Smith M., Pereira J., Kasai F. Chromosome sequencing: the fifth and final era of cytogenetics // *Mol. Cytogenet.* 2017. Vol. 10 (Suppl. 1): 1.
2. Кашеварова А.А., Лебедев И.Н., Назаренко Л.П. Архитектура генома и хромосомные болезни. Синдромы реципрокных микроделеций и микродупликаций: атлас / Под ред. акад. РАН, проф. В.П. Пузырёва. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2014. – 56 с.
3. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability. *Mol. Cytogenet.* 2014. Vol. 7: 97.
4. Gridina M.M., Matveeva N.M., Fishman V.S. et al. Allele-specific biased expression of the CNTN6 gene in iPS cell-derived neurons from a patient with intellectual disability and 3p26.3 microduplication involving the CNTN6 gene. *Mol. Neurobiol.* 2018. doi: 10.1007/s12035-017-0851-5.
5. Plona K., Kim T., Halloran K., Wynshaw-Boris A. Chromosome therapy: potential strategies for the correction of severe chromosome aberrations // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2016. Vol. 172. P. 422-430.

UDC 575.224.23

## FRONTIERS OF CLINICAL AND BASIC CYTOGENETICS IN THE ERA OF GENOME AND POSTGENOME TECHNOLOGIES

**Lebedev I.N.**

*Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, Russia  
Ushaika street, 10, Tomsk, 634050, Russia  
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru*

Progress in genome sequencing and editing technologies supported by cell reprogramming methods provide a unique base for breakthrough researches in human cytogenetics related to novel classification of chromosomal diseases, understanding of their pathogenesis and development of novel diagnostic technologies.

**Key words:** induced pluripotent stem cells; microdeletion and microduplication syndromes; karyotype editing, chromosomal diseases, cytogenetics.

Technological transition from genomic to post-genomic era, accompanied by the appearance of new high-end methods of genome analysis, its editing and reprogramming, ensured the entry of clinical and basic cytogenetics into the fifth phase of development, designated as «chromosome sequencing» [1]. A look at the chromosome in the context of some sequence of nucleotides, along with advances in the study of the principles of organization, variability and functioning of the human genome, made it possible to significantly improve the concept of the diversity and pathogenesis of a specific class of hereditary diseases caused by the reorganization of genetic information at the chromosome level. The key point, however, was a change in the object of cytogenetic analysis per se. Without denying the exceptional value of the standard karyotyping of metaphase chromosome preparations, which is still the «gold standard» in cytogenetics, many breakthrough achievements in this discipline have been made or are expected at the genomic, cellular or even tissue level. In particular, the identification of segmental duplications repeats in the human genome made it possible to conclude that some aberrant recombination events are predetermined, leading to the recurrent microchromosome aberrations. Such recurrent chromosome rearrangements underlie the formation of a new class of chromosomal diseases – syndromes of reciprocal microdeletions and microduplications [2]. Thus, it should be noted that the molecular cytogenetic technologies for diagnostics of chromosomal abnormalities have been transformed gradually in the technologies of describing novel chromosomal syndromes.

The next key point is a significant increase in the resolution power of molecular cytogenetic analysis, which made it possible to limit the detected chromosomal microaberrations at the level of single gene or even its fragments. As a result, a novel class of chromosomal diseases appeared, represented by single gene microdeletions and microduplications [3]. Despite the apparent blurring of the boundaries between monogenic and chromosomal diseases, the latter, nevertheless, retain their features of inheritance and pathogenesis.

As to pathogenesis of chromosomal diseases, the future for its understanding strongly depends on the progress in the cell biology. The emergence of technologies for obtaining cells with induced pluripotency and methods for their directed differentiation made it possible to create models of chromosome aberrations in vitro. For the first time, it became possible to study the expression of genes in target types of autologous cells from patients with unique chromosomal aberrations [4]. Finally, the biological features of chromosome segregation in induced pluripotent stem cells for the first time designated the task of «chromosome therapy» for human diseases [5], not only bringing cytogenetics to a new level of development, but also indicating new development horizons for all medical genetics and post-genomic medicine.

The study was carried out within the framework of the Agreement on a Subsidy No. 14.601.21.0015 dated October 23, 2017 between the Ministry of Education and Science of the Russian Federation and Tomsk National Research Medical Center for the implementation of research work on the topic: «Development of a forecast for the implementation of the priority of scientific and technological development defined in paragraph 20b «Transition to personalized medicine, high-tech health care and health saving technologies, including through the rational use of medicines (especially antibacterial)» Strategy of the Russian Federation scientific and technological development». The unique identifier of the work (project) RFMEF160117X0015. The identifier of the government contract / contract of the institution / contract (agreement) 000000007417PE10002.

**References:**

1. Ferguson-Smith M., Pereira J., Kasai F. *Chromosome sequencing: the fifth and final era of cytogenetics* // *Mol. Cytogenet.* 2017. Vol. 10 (Suppl. 1): 1.
2. Kashevarova A.A., Lebedev I.N., Nazarenko L.P. *Genome architecture and chromosomal diseases. Syndromes of reciprocal microdeletions and microduplications: an atlas* / Ed. Acad RAS, Prof. V.P. Puzyrev. – Tomsk: Pechatnaya manufactura, 2014. – 56 p.
3. Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S. et al. *Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability.* *Mol. Cytogenet.* 2014. Vol. 7: 97.
4. Gridina M.M., Matveeva N.M., Fishman V.S. et al. *Allele-specific biased expression of the CNTN6 gene in iPS cell-derived neurons from a patient with intellectual disability and 3p26.3 microduplication involving the CNTN6 gene.* *Mol. Neurobiol.* 2018. doi: 10.1007/s12035-017-0851-5.
5. Plona K., Kim T., Halloran K., Wynshaw-Boris A. *Chromosome therapy: potential strategies for the correction of severe chromosome aberrations* // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 2016. Vol. 172. P. 422-430.

УДК 61:001.12/.18

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО РЫНКА ПОСТГЕНОМНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

**Кривенко А.Н., Кайшева А.Л., Федорончук Т.В.**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича", Москва, Россия  
 119121, гор. Москва, ул. Погодинская 10/8  
 e-mail: krivenko.sgc@gmail.com

Выполнен анализ рынков и секторов экономики, развитие которых обеспечивается реализацией приоритета «20в» «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения» в области постгеномных технологий, перечня ключевых технологий, включая редактирование генома и молекулярное профилирование, на основе анализа «больших» данных с учетом рассмотрения ключевых российских и зарубежных стратегических и прогнозных документов, прогнозов крупных корпораций и консалтинговых агентств, новостных и научных открытий российских и зарубежных ресурсов. Рынок постгеномных технологий в России активно развивается. Сегменты рынка демонстрируют высокие темпы роста, следуя в русле мировых тенденций. Государственные институты развития приняли ряд программ, направленных на поддержку и развитие сектора практического внедрения постгеномных технологий.

**Ключевые слова:** постгеномные технологии, рынок, биотехнологии, зеленые технологии, белые технологии, красные технологии

Успешное завершение международного проекта «Геном человека» кардинальным образом изменило направление развития современной медицины, и еще большие изменения можно предвидеть в недалеком будущем. Приоритетной задачей современной медицины является внедрение новых технологий в повседневную практику [1].

Постгеномные технологии (ПГТ) опираются на знания о геномах живых организмов. К ним относят генетическое редактирование и молекулярное профилирование, включая эпигеномику, транскриптомику, протеомику, метиломику, метаболомику, интерактомику [2]. Потенциал ПГТ сложно переоценить, поскольку его реализация обеспечит очередной технологический скачок и ознаменует переход к медицине нового типа. С практической точки зрения, это означает радикальное улучшение диагностики, переход к персонализированной и превентивной медицине, создание новых лекарств, а также применение принципиально новых методов лечения [3].

ПГТ являются сквозными технологиями и помимо медицины, способны обеспечить научно-технологический прорыв в вопросах селекции новых и совершенствовании существующих сортов растений, пород животных, промышленной биотехнологии и проч. Показателем эффективности применения постгеномных технологий в профилактической медицине является способность конкретного организма долговременно выдерживать воздействие определенного сочетания неблагоприятных факторов без запуска компенсаторных механизмов.

Гармонично развиваются в постгеномной эре технологии генетического редактирования (РГ). Сегодня технологии РГ из научно-исследовательских лабораторий в ряде стран переходят в клиническую практику

[4]. Разрабатываются принципиально новые методы для исправления генетических нарушений у человека в любом возрасте (FDR, 2017).

Рынок биотехнологий в России развивается бурными темпами, однако значительно отстает от показателей западных стран. На государственном уровне были приняты ряд программ, поддерживающих развитие биотехнологий в различных отраслях. Важная роль в развитии отрасли отводится Технологическим платформам «Медицина будущего», «Биотех 2030», «Биоэнергетика», а также национальные технологические инициативы «ХелсНет» и «ФудНет». Акцентированы национальные технологические инициативы на импортозамещение. При поддержке программы «Фарма-2020» создаются аналоги зарубежных препаратов.

По предварительным оценкам к 2030-х г. будут достигнуты следующие экономические эффекты от развития ПГТ:

- развитие внутреннего рынка Российской Федерации (до 34 млрд. долл. к 2035 году), рост экспортного потенциала за счёт выхода российских поставщиков продукции и услуг на международную арену (до 150 млрд. долл. к 2035 году);
- увеличение доли компаний из РФ на мировом рынке до 15% в странах БРИКС и до 10% в остальном мире;
- рост конкурентоспособности отечественного сельского хозяйства на внутреннем и мировом рынке и достижение к 2035 году доли экспорта отечественных сельскохозяйственных культур и продукции племенного и товарного животноводства в общем объеме российского производства (в том числе, в виде семян и генного материала) 35-40%;
- рост уровня возврата государственных инвестиций в НИОКР в области развития отечественных компетенций в селекции сельскохозяйственных культур и товарного и племенного животноводства на 30-40%.

Источник финансирования: федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», соглашение о предоставлении субсидии от 23.10.2017 г. № 14.601.21.0015. Уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEF160117X0015. Идентификатор государственного соглашения 0000000007417PE10002.

#### Литература:

1. Арчакова А.И. Постгеномные технологии и молекулярная медицина // Вестник российской академии наук. 2004. Т. 74(5).
2. Bai J.P.F., Melas I.N., Hur J. Advances in omics for informed pharmaceutical research and development in the era of systems medicine // Expert Opin Drug Discov. 2017. P.1–4.
3. Cheng T., Zhan X. Pattern recognition for predictive, preventive, and personalized medicine in cancer // EPMA J. 2017. Vol. 8. P.51–60.
4. Ando D., Meyer K. Gene Editing: Regulatory and Translation to Clinic // Hematol Oncol Clin North Am. 2017. Vol. 31. №5. P.797–808.

UDC 61:001.12/.18

## DEVELOPMENT OF RUSSIA'S MARKET FOR POSTGENOME TECHNOLOGIES

**Krivenko A.N., Kaysheva A.L., Fedoronchuk T.V.**

V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry  
119121, Moscow, Pogodinskaya, 10/8  
e-mail: krivenko.sgc@gmail.com

The analysis of markets and sectors of the economy, the development of which is ensured by Strategy priority implementation 20c “Transition to personalized medicine, high-tech healthcare and health-saving technologies, inter alia, through rational use of medication (primarily antibacterial)” in the field of postgenomic technologies, a list of key technologies, including genome editing and molecular profiling, based on analysis of big data taking into account consideration of key Russian and foreign strategic and forecast documents, forecasts of large corporations and consulting agencies, new scientific and financial open Russian and foreign resources. The market of postgenomic technologies in Russia is actively developing. Segments of the market demonstrate

**Key words:** postgenomic technologies, market, biotechnologies, green technologies, white technologies, red technologies.

The successful completion of the international Human Genome Project radically changed the direction of



development of modern medicine, and even greater changes can be foreseen in the near future. The priority task of modern medicine is the introduction of new technologies in everyday practice [1].

Postgenomic technologies (PGT) rely on knowledge of the genomes of living organisms. These include genetic editing and molecular profiling, including epigenomics, transcriptomics, proteomics, methylomics, metabolomics, etc. [2]. The potential of the PGT is difficult to overestimate, as its implementation will provide the next technological leap and will mark the transition to a new type of medicine. From a practical point of view, this means a radical improvement in diagnosis, the transition to personalized and preventive medicine, the creation of new drugs, and the use of fundamentally different therapies [3].

PGT are end-to-end technologies and, apart from medicine, they can provide a scientific and technological breakthrough in the issues of breeding new and improving existing plant varieties, animal breeds, industrial biotechnology, and so on. An indicator of the effectiveness of the application of PGT in preventive medicine is the ability of a particular organism to withstand a certain combination of unfavorable factors for a long time without triggering compensatory mechanisms.

Harmoniously developed in the postgenomic era of gene editing technology. Today, the technologies of the gene editing from research laboratories in a number of countries are turning into clinical practice [4]. Essentially new methods are being developed to correct genetic disorders in humans (FDR, 2017).

The biotechnology market in Russia is developing at a rapid pace, but it lags far behind the performance of Western countries. At the state level, a number of programs have been adopted that support the development of biotechnologies in various sectors. An important role in the development of the industry is assigned to the technological platforms "Medicine of the Future", "Biotech 2030", "Bioenergetics", as well as national technological initiatives "HealthNet" and "FoodNET". National technological initiatives on import substitution are emphasized. With the support of the "Pharma-2020" program analogues of foreign preparations are being created.

According to preliminary estimates, by the 2030s the following economic effects will be achieved from the development of the city:

- development of the domestic market of the Russian Federation (up to \$ 34 billion by 2035), growth of export potential due to the output of Russian suppliers of products and services to the international arena (up to \$ 150 billion by 2035);
- increasing the share of companies from the Russian Federation on the world market to 15% in the BRICS countries and up to 10% in the rest of the world;
- growth of competitiveness of domestic agriculture in the domestic and world markets and achievement by 2035 of a share of exports of domestic agricultural crops and products of pedigree and commodity livestock production in the total volume of Russian production (including seed and gene material) 35-40%;
- an increase in the level of return of public investment in R & D in the development of domestic competencies in the selection of crops and commodity and livestock breeding by 30-40%.

Source of funding: the federal target program "Research and development in the priority areas of Russia scientific and technological complex development for 2014-2020 years", an agreement on granting a subsidy on October 23, 2017 No. 14.601.21.0015 for research on the topic: "Development of the forecast for the implementation priority of scientific and technological development defined in paragraph 20c "The transition to personalized medicine, ..." of the Strategy of scientific and technological development of the Russian Federation". The unique identifier of the work (project) RFMEF160117X0015. The identifier of the state agreement 000000007417PE10002.

#### References:

1. Archakov A.I. *Postgenomic technologies and molecular medicine // Bulletin of the Russian Academy of Sciences.* 2004. T. 74 (5).
  2. Bai J.P.F., Melas I.N., Hur J. *Advances in omics for informed pharmaceutical research and development in the era of systems medicine. Expert Opinion on Drug Discovery.* 2017. R.1-4.
  3. Cheng T., Zhan X. *Pattern recognition for predictive, preventive, and personalized medicine in cancer. EPMA J.* 2017. Vol. 8. P.51-60. doi: 10.1007 / s13167-017-0083-9.
  4. Ando, D., Meyer, K., *Gene, Editing: Regulatory and Translation to Clinic, Hematol, Oncol, Clinic, North Am.* 2017. Vol. 31. № 5. P.797-808. doi: 10.1016 / j.hoc.2017.06.002.
- УДК 61:001.12/.18

## ПЕРСПЕКТИВЫ РЕАЛИЗАЦИИ СТРАТЕГИИ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ОБЛАСТИ МЕДИЦИНЫ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПИЛОТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ «МЕДИЦИНА БУДУЩЕГО»

Каминский И.П., Ваизова О.Е., Спицко Ж.А. Энглевский Н.А., Кокорина Д.А.

Некоммерческое партнерство «Технологическая платформа «Медицина будущего», г. Томск, Россия  
634055, Томск, пр. Академический, 8/8  
e-mail: medicff@yandex.ru

Технологической платформой «Медицина будущего» проведено пилотное экспертное исследование по определению основных рынков, продуктов и технологий, связанных с реализацией приоритета Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)». Показано, что основными рынками, способствующими реализации приоритета, являются рынки регенеративной и персонализированной медицины, биофармацевтических лекарственных средств. В качестве приоритетных направлений исследований и разработок выделены: терапевтические и иммунотерапевтические клеточные продукты; тканеинженерные технологии и конструкции, медицинские материалы с функциональной структурой; новые поколения антибиотиков и иммунобиологических вакцин и др.

**Ключевые слова:** форсайт, научно-технологический прогноз, стратегия научно-технологического развития, анкетирование, эксперты, рынок, продукт, технология, направление исследований и разработок.

В соответствии с положениями Федерального закона № 172-ФЗ «О стратегическом планировании в РФ» была разработана утвержденная указом Президента от 1 декабря №642 Стратегия научно-технологического развития (Стратегия), определившая основные направления и приоритеты государственной политики, направленные на устойчивое, динамичное и сбалансированное развитие Российской Федерации на долгосрочный период, и отвечающие на большие вызовы. В этой стратегии особую социальную значимость имеет приоритет, определенный пунктом 20в – «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)». Здоровьесбережение и персонализация являются основой сохранения и приумножения народонаселения, обеспечивающих социальный аспект экономического развития России.

В данном контексте важнейшей задачей является выявление наиболее актуальных и востребованных векторов реализации Стратегии, в которых в явном виде должны быть сформулированы направления исследований и разработок, предназначенные для создания технологических ответов на основные вызовы современному здравоохранению. В основе методологии их выявления лежат прогнозно-аналитические исследования. В данной работе мы приводим предварительные результаты этих исследований, проведенных с участием профильных экспертов Технологической платформы «Медицина будущего».

Экспертные исследования проводились с использованием метода анкетирования. Экспертные анкеты, разработанные при участии Высшей школы экономики (г. Москва), подразумевали построение логической последовательности объектов научно-технологического прогноза от профильных рынков, создание или развитие которых будет способствовать реализации обозначенного приоритета, до конкретных направлений исследований и разработок, лежащих в основе создания технологий и продуктов/услуг, формирующих данные профильные рынки в будущем.

В соответствии с предварительными результатами проведенного экспертного исследования, наиболее значимыми рынками для реализации приоритета Стратегии являются рынок регенеративной медицины, рынок персонализированной медицины, а также рынок биофармацевтических лекарственных средств. Именно эти рынки будут включать те продукты и услуги, которые позволяют реализовать ожидания пациентов в персонализированной и профилактической медицине. Научно-технологическую основу этих рынков составляют клеточные биотехнологии, иммунобиотехнологии и биоинженерия, системная и структурная биология и другие. Установлено, что большинство научных областей, спрос на которые продемонстрировали эксперты, относится к биотехнологии. В пользу этого утверждения свидетельствуют и современные тенденции и прогнозы развития медицинских рынков ведущих стран.

В качестве приоритетных направлений исследований и разработок выделены: терапевтические и иммунотерапевтические клеточные продукты; тканеинженерные технологии и конструкции, медицинские материалы с функциональной структурой; новые поколения антибиотиков и иммунобиологических вакцин и др.

Следующий этап данного исследования будет посвящен анализу уровня конкурентоспособности рынков, продуктов, технологий и направлений, выделенных на предварительном этапе. Результаты анализа лягут в основу разрабатываемой методики по уточнению и корректировке научно-технологических приоритетов исследований и разработок.

Источник финансирования: федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы», соглашение о предоставлении субсидии от 23.10.2017 г. № 14.601.21.0015 на проведение исследований по теме: «Разработка прогноза реализации приоритета научно-технологического развития, определенного пунктом 20в «Переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных)» Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации». Уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEF160117X0015. Идентификатор государственного соглашения 0000000007417PE10002.

UDC 61:001.12/.18

## **PERSPECTIVES OF IMPLEMENTATION OF THE STRATEGY OF SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF THE RUSSIAN FEDERATION IN THE FIELD OF MEDICINE: THE RESULTS OF THE PILOT STUDY OF THE TECHNOLOGY PLATFORM «MEDICINE OF THE FUTURE»**

**Kaminskii I.P., Vaizova O.E., Spitsko Z.A., Englevskiy N.A., Kokorina D.A.**

*Non-commercial Partnership "Technological Platform "Medicine of the Future", Tomsk, Russia  
 634055, Tomsk, Academic Ave., 8/8  
 e-mail: medicff@yandex.ru*

The technology platform «Medicine of the future» conducted a pilot expert study to determine the main markets, products and technologies related to the implementation of the priority Strategy of scientific and technological development of the Russian Federation «Transition to personalized medicine, high-tech health care and health saving technologies, through the rational use of medicines (especially antibacterial) among other factors». It was shown that the main markets contributing to the implementation of priority are the markets of regenerative and personalized medicine and biopharmaceutical market. The following priority research and development areas were identified: cellular therapy products and cellular immunotherapy products; tissue-engineered technologies, medical supplies with the functional structure; new generation of antibiotics and immunobiological vaccines and others.

**Key words:** foresight; scientific and technological forecast; strategy of scientific and technological development; questionnaire survey; experts; market; product; technology; research and development area.

In accordance with the provisions of the Federal law no. 172-FZ «On strategic planning in the Russian Federation», the strategy of the scientific and technological development (the Strategy) approved by the Order of the President on 1 December 2016 No. 642 was developed. The Strategy sets out the main guidelines and priorities for government policy aimed at stable, sustainable and balanced scientific and technological development of the Russian Federation on a long-term basis and responding to big challenges. The priority defined in paragraph 20c – the transition to personalized medicine, high-tech health care and health saving technologies, through the rational use of medicines (especially antibacterial), has an important social meaning in this Strategy. Health care/health protection and personalization are the basis for the preservation and enhancement of the population, providing a social aspect of economic development in Russia.

In this context, the most important task is to identify the most relevant and popular vectors for the implementation of the Strategy. These key vectors should be clearly formulated and should contain the areas of research and development, intended to develop technological responses to the main challenges of modern health care. The methodology of their identification is based on prognostic and analytical studies. In this paper, we present the preliminary results of these studies conducted with the participation of subject matter experts of the Technology platform «Medicine of the Future».

Expert studies were conducted using the questionnaire method. Expert questionnaires were developed with the participation of The National Research University Higher School of Economics (Moscow) and aimed to building a logical sequence of objects of scientific and technological forecast from core markets, the creation or development of which will contribute to the implementation of the identified priority to specific areas of research and development, underpinning the development of technologies and products/services, forming these core markets in the future.

According to the preliminary results of the expert study, the most important markets for the implementation of the Strategy's priority are the market of regenerative medicine, the market of personalized medicine, as well as the biopharmaceutical market. These are the markets that will include products and services that enable patients to realize their expectations in personalized and preventive medicine. The scientific and technical basis of these markets is cellular biotechnologies, immunobiotechnologies and bioengineering, systems and structural biology and others. It was established that the majority of scientific fields, the demand for which was demonstrated by experts, refers to biotechnology. Modern tendencies and forecasts of development of medical markets of the leading countries support this statement.

The following priority research and development areas were identified: cellular therapy products and cellular immunotherapy products; tissue-engineered technologies, medical supplies with the functional structure; new generation of antibiotics and immunobiological vaccines and others.

The next stage of this study will be devoted to the analysis of the competitiveness level of markets, products, technologies and areas identified at the preliminary stage. The results of the analysis will form the basis of the developed methodology used to clarify and adjust the scientific and technological priorities of research.

Source of funding: the federal target program "Research and development in the priority areas of Russia scientific and technological complex development for 2014-2020 years", an agreement on granting a subsidy on October 23, 2017 No. 14.601.21.0015 for research on the topic: "Development of the forecast for the implementation priority of scientific and technological development defined in paragraph 20c "The transition to personalized medicine, high-tech health care and health saving technologies, through the rational use of medicines (especially antibacterial)" of the Strategy of scientific and technological development of the Russian Federation". The unique identifier of the work (project) RFMEF160117X0015. The identifier of the state agreement 000000007417PE10002.

УДК 577.218

## ПОДАВЛЕНИЕ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА L-АСПАРАГИНАЗОЙ RHODOSPIRILLUM RUBRUM, СВЯЗАННОЕ С ИНГИБИРОВАНИЕМ АКТИВНОСТИ ТЕЛОМЕРАЗЫ

Плясова А. А.<sup>1,2</sup>, Жданов Д. Д.<sup>1,3</sup>, Покровская М. В.<sup>1</sup>, Покровский В. С.<sup>1,3</sup>, Александрова С. С.<sup>1</sup>, Соколов Н. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича  
119121, Москва, Россия, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

<sup>2</sup> Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева  
125047, Москва, Россия, Миусская площадь, д. 9

<sup>3</sup> Российский университет дружбы народов (Университет РУДН)  
117198, Москва, Россия, ул. Миклухо-Маклая, д.6  
e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Мутант L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* RrA E149R, V150P, F151T (RrA) способен проникать в клетки, подавлять экспрессию каталитической субъединицы теломеразы hTERT и ингибировать теломеразу в клетках опухолевых линий человека SCOV-3, SkBr-3 и A549. RrA тормозила рост ксенографтных опухолей.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа *Rhodospirillum rubrum*, теломераза, теломеры, противоопухолевая активность.

L-Аспарагиназа, катализирующая дезамидирование L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и аммиака, широко используется в комбинированной химиотерапии острых лимфобластных лейкозов. Ранее нами было показано, что мутантные формы E149R, V150P, F151T L-аспарагиназы *Rhodospirillum rubrum* (RrA) подавляют активность теломеразы в лейкозных клетках и усиливают его противоопухолевую активность [1]. Целью исследования явилась оценка способности RrA ингибировать активность теломеразы и оказывать влияние на пролиферацию клеток различных опухолевых линий *in vitro* и *in vivo*. Для экспериментов *in vitro* использовали клетки T-клеточной лимфомы человека Jurkat, аденокарциномы молочной

железы SkBr-3, рака яичника SKOV-3 и рака легкого A549. RrA конъюгировали с FITC и с помощью проточной цитометрии изучали локализацию фермента в клетке. Прямую цитотоксичность RrA определяли через 72 ч инкубации с клетками методом МТТ-теста. Мыши линии Balb/c nude использовали для изучения противоопухолевой активности RrA на моделях опухолей SkBr-3, SKOV-3 и A549. Уровень экспрессии каталитической субъединицы теломеразы hTERT определяли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Активность теломеразы измеряли по протоколу амплификации теломерных повторов (TRAP методу). Длину теломер клеток определяли методом ПЦР в реальном времени. Результаты проточной цитометрии показали, что конъюгированная с FITC RrA способна проникать в клетки. Цитотоксическая активность RrA была дозо-зависимой для всех клеточных линий. Наиболее чувствительными к действию RrA оказались клетки линии SkBr-3, а наиболее устойчивыми - клетки SKOV-3. RrA подавляла активность теломеразы при длительном культивировании клеток. Активность теломеразы в культивированных с RrA клетках, не превышала  $29,63 \pm 12,3\%$  от таковой в контроле. Не обнаружено существенной разницы между эффективностью ингибирования в клетках различных линий. Результаты ПЦР в реальном времени показали, что длина теломер в клетках SKOV-3 постепенно уменьшается до  $1233 \pm 636$  п.о. через 35 дней культивирования с RrA. Длина теломер в клетках SkBr-3 снизилась до  $980 \pm 421$  п.о. через 21 день эксперимента. В клетках A549, у которых изначально были самые короткие теломеры, их размер уменьшился до  $637 \pm 288$  п.о. через 14 дней культивирования. Для проверки влияния RrA на рост опухоли, клетки вышеуказанных линий были привиты бестимусным мышам. Ингибирование роста опухоли наблюдали во всех трех группах опухолей (SKOV-3: TGI=37%,  $p=0.112$ , SkBr-3: TGI =28%,  $p=0.077$ ; A549: TGI =52%,  $p=0,055$ ). Проведено изучение влияние RrA на активность теломеразы в опухолях *in vivo*. Введение фермента вызывало снижение экспрессии hTERT на 49,5-53,3% в опухолях всех типов. Подавление экспрессии hTERT сопровождалось угнетением активности теломеразы на 46,9-57,2%. На основании полученных результатов можно предположить, что длительное воздействие RrA *in vitro*. вызывает ингибирование теломеразы в клетках опухолей SKOV-3, SkBr-3 и A549 и приводит их к гибели вследствие уменьшения длины теломер. Несмотря на относительно слабый противоопухолевой эффект, RrA способна подавлять экспрессию hTERT, активность теломеразы и индуцировать укорочение теломер в образцах ксенографтных опухолей *in vivo*. Таким образом, ингибирование теломеразы с помощью RrA может рассматриваться как перспективный подход к терапии злокачественных заболеваний. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

#### Литература:

Pokrovskaya M.V., Zhdanov D.D., Eldarov M.A., Aleksandrova S.S., Veselovsky A.V., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Gladilina J.A., Sokolov N.N. Suppression of telomerase activity in leukemic cells by mutant forms of *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase // *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2017, Vol. 11. № 3. P. 219-233.

UDC 577.218

## RHODOSPIRILLUM RUBRUM L-ASPARAGINASE AFFECTS TUMOR GROWTH THROUGH TELOMERASE INHIBITION

Plyasova A.A.<sup>1,2</sup>, Zhdanov D.D.<sup>1,3</sup>, Pokrovskaya M.V.<sup>1</sup>, Pokrovsky V.S.<sup>1,3</sup>, Alexandrova S.S.<sup>1</sup>, Sokolov N.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biomedical Chemistry

119121, Moscow, Russia, Pogodinskaya st. 10/8

<sup>2</sup> D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

125047, Moscow, Russia, Miuskaya sq. 9

<sup>3</sup> Peoples Friendship University of Russia (RUDN University)

117198, Moscow, Russia, Miklukho-Maklaya 6

\* e-mail: zhdanovdd@mail.ru

*Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase mutant RrA E149R, V150P, F151T (RrA) could translocate into cells and inhibit telomerase activity in SKOV-3, SkBr-3 and A549 human cancer cell lines due to its ability to down-regulate the expression of telomerase catalytic subunit hTERT. RrA treatment of xenograft models showed inhibition of tumor growth.

**Key words:** *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase, telomerase, telomeres, antitumor activity

L-Asparaginase is an enzyme catalyzing the deamination of L-asparagine with the formation of aspartic acid and ammonia is considered as a promising agent for combined chemotherapy of acute lymphoblastic leukemia. Our previous finding suggests that E149R, V150P, F151T mutant of L-asparaginase, derived from *Rhodospirillum rubrum*

(RrA), suppress telomerase activity in leukemic cells, making a considerable contribution to anticancer activity of the enzyme [1]. The aim of the study was to evaluate RrA anti-telomerase activity and its effect on cell proliferation on various cancer models in vitro and in vivo. Human T cell lymphoma Jurkat, breast adenocarcinoma SkBr-3, ovarian cancer SKOV-3 and lung carcinoma A549 were used as the in vitro model in this study. RrA was conjugated with FITC and its ability to localize in cells was determined by flow cytometry. Direct cytotoxic activity of RrA was tested in 72 h of incubation by MTT-test. Balb/c nude mice were used for xenograft studies of SkBr-3, SKOV-3 and A549 tumors. The expression of telomerase catalytic subunit hTERT was determined by real time RT-PCR. Telomerase activity was measured by telomeric repeat amplification protocol (TRAP assay). The length of telomeres was measured by real time PCR. Flow cytometry results showed that FITC-conjugated RrA could translocate into cells. RrA showed dose-dependent cytotoxic effect for all cell lines. SkBr-3 cells were the most sensitive, while SKOV-3 cells showed the highest resistance for RrA. RrA could suppress activity of telomerase during prolong cultivation. Telomerase activity in treated cells did not exceed  $29.63 \pm 12.3\%$  and was not lower than  $8.06 \pm 4.47\%$  of control cells. We did not observe significant difference between efficiency of inhibition in cell types. RrA was found to downregulate hTERT expression during the time of in vitro cultivation. Using real time PCR we showed that length of telomeres in SKOV-3 cells has been gradually decreasing to  $1233 \pm 636$  b.p. after 35 days of cultivation. Telomeres length in SkBr-3 cells decreased to  $980 \pm 421$  b.p. after 21 days of cultivation. A549 cells which have initially shortest telomeres were found to have  $637 \pm 288$  b.p. after 14 days of cultivation. To test the effect of RrA on tumor growth, we established subcutaneous tumor cells in mice. RrA treatment led to the decrease in tumor size in A549 xenografts. At the end of treatment, all 3 groups showed inhibited tumor growth (SKOV-3: TGI=37%,  $p=0.112$ , SkBr-3: TGI=28%,  $p=0.077$ ; A549: TGI=52%,  $p=0.055$ ). We examined the effect of in vivo RrA administration on telomerase activity in tumors. RrA led to 49.5-53.3% of decrease in hTERT expression in the all tumors. Down-regulated hTERT expression was associated with 46.9-57.2% of suppression in telomerase activity. Taken together, our results showed that telomerase inhibition in cancer SKOV-3, SkBr-3, and A549 cells due to the prolonged exposure to RrA induced telomere shortening cell death in vitro. Regardless rather weak antitumor activity RrA could suppress hTERT expression, telomerase activity and induces attrition of telomeres in xenograft tumor models in vivo. Thus, telomerase inhibition using RrA may be considered as promising approach for cancer treatment. The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013-2020.

#### References:

1. Pokrovskaya M.V., Zhdanov D.D., Eldarov M.A., Aleksandrova S.S., Veselovsky A.V., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Gladilina J.A., Sokolov N.N. Suppression of telomerase activity in leukemic cells by mutant forms of *Rhodospirillum rubrum* L-asparaginase // *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, 2017, Vol. 11. № 3. P. 219-233.

УДК 578.247

## ПОИСК ФАКТОРОВ РЕПЛИКАЦИИ HTLV-1 С ПОМОЩЬЮ СКРИНИНГА БИБЛИОТЕКИ НОКАУТОВ GESCO

Атемасова А.А.<sup>1,2</sup>, Зотова А.А.<sup>1,2</sup>, Лопатухина Е.В.<sup>1,3</sup>, Мазуров Д.В.<sup>3</sup>

1. Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия;

2. "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России, Москва, Россия;

3. Институт биологии гена РАН, Группа клеточных и генных технологий, Москва, Россия  
Россия, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5, 119334

e-mail: justatemasova@gmail.com

Мы провели скрининг библиотеки нокаутов GeCKO на основе CRISPR/Cas9 в инфекционном тесте путем культивирования HTLV-1-инфицированных клеток MT2 и клеток Raji/CD4 с библиотекой нокаутов. Мы получили пул клеток, резистентных к инфекции HTLV-1, и методом NGS-анализа обнаружили в этой популяции около десяти наиболее встречающихся генетических нокаутов.

**Ключевые слова:** CRISPR-Cas9, библиотека нокаутов, NGS, HTLV-1, факторы репликации

Т-лимфотропный вирус человека (HTLV-1) наряду с ВИЧ-1 является патогенным для человека ретровирусом. HTLV-1 заражает CD4 и CD8 Т-лимфоциты и вызывает развитие острого Т-клеточного лейкоза или воспалительный аутоиммунно-дегенеративный процесс в спинном мозге. Так же, как и у ВИЧ-1, репликация HTLV-1 зависит от множества клеточных белков, в совокупности называемых факторами репликации. В отличие от факторов рестрикции, которые подавляют размножение вируса, факторы репликации, включая рецепторы

вируса, обеспечивают пермиссивность клетки для размножения вируса. Мы провели скрининг библиотеки нокаутов GeCKO на основе CRISPR/Cas9 в инфекционном тесте путем сокультивирования HTLV-1-инфицированных клеток MT2 и клеток Raji/CD4 с библиотекой нокаутов. При заражении клеток библиотеки клетками MT2 удалось выявить устойчивые к инфекции клетки. С помощью глубокого секвенирования были выявлены гены, нокауты которых определяют эту устойчивость клеток к инфекции. Среди них, в частности, интересен ген *kpna-1*, поскольку в литературе можно найти немало свидетельств взаимодействия KPNA-1 с белками других вирусов, а именно, с Vpr близкого HTLV-1 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1), с UL84 цитомегаловируса, VP24 вируса Эболы. Разработанная нами система поиска факторов репликации HTLV-1 является на данный момент единственной в своем роде. Выяснение роли данных белков в HTLV-1 инфекции поможет найти новые мишени для анти-HTLV-1 терапии.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ "Изучение роли KPNA1, CD82 и ряда других белков в репликации HTLV-1, выявленных с помощью скрининга библиотеки нокаутов GeCKO" 18-34-00712

Литература:

1. Robert C. Gallo. *Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. Best Practice & Research Clinical Haematology* 24 (2011) 559–56
2. Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, et al. *Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science* (2014) 343, 84–87.

UDC 578.247

## SEARCHING FOR CELLULAR FACTORS INVOLVED IN HTLV-1 REPLICATION AND SELECTED AFTER GECKO LIBRARY SCREENING

Atemasova A.A.<sup>1,2</sup>, Zotova A.A.<sup>1,2</sup>, Lopatukhina E.V.<sup>1,3</sup>, Mazurov D.V.<sup>3</sup>

1. Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;
2. NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russia;
3. Cell and Gene Technology Group, Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia  
Russia, Moscow, 34/5 Vavilova Street, 119334  
e-mail: justatemasova@gmail.com

We performed GeCKO library screening in HTLV-1 infection assay to determine cellular factors involved in HTLV-1 cell-to-cell transmission and replication. After coculturing HTLV-1 chronically transformed cells MT2 with Raji/CD4 library cells we obtained a population of HTLV-1 resistant library cells which was analyzed by NGS in order to reveal factors, which knockouts mediate resistance to HTLV-1.

**Key words:** CRISPR-Cas9, GeCKO knockout library, NGS, HTLV-1, replication factors

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) along with HIV-1 is a human pathogenic retrovirus that infects CD4 and CD8 T-lymphocytes and causes adult T-cell leukemia or an inflammatory disorder called HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. There are many cellular factors involved in HTLV-1 replication called replication factors. Unlike restriction factors that inhibit viral transmission, replication factors make cells permissive to infection. We performed GeCKO library screening in HTLV-1 infection assay to determine cellular factors (including not completely discovered viral receptors) involved in HTLV-1 cell-to-cell transmission and replication. After coculturing HTLV-1 chronically transformed cells MT2 with Raji/CD4 library cells we obtained a population of HTLV-1 resistant library cells which was analyzed by NGS in order to reveal factors, which knockouts mediate resistance to HTLV-1. Among them, we found *kpna-1* as a promising candidate for HTLV-1 replication factor. KPNA-1 functions in nuclear import and there is an evidence that KPNA-1 binds to human cytomegalovirus UL84, to ebolavirus VP24 and to HIV-1 Vpr and promotes import of the viral proteins into the nucleus. The role of KPNA-1 in HTLV-1 replication is unknown. We believe the knowledge about molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission and replication will help to find new targets for antiviral therapy.

The project was supported by domestic grant Russian Foundation For Basic Research (RFBR) 18-34-00712 "Role of KPNA1, CD82 and other cellular factors involved in HTLV-1 replication and selected after GeCKO library screening"

References:

1. Robert C. Gallo. *Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. Best Practice & Research Clinical Haematology* 24 (2011) 559–56
2. Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, et al. *Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science* (2014) 343, 84–87.

УДК: 577.29.

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА DEBARYOMYCES HANSENIИ

Д.К.Армянинова<sup>1</sup>, Д.С.Карпов<sup>2</sup>, М.Котлов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов (РУДН), Россия, 117198, Москва, Миклухо-Маклая, 10/2, *dasha.arm@yandex.ru*, 89175491453

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН), Россия, 119991, Москва, Вавилова, 32, *aleom@yandex.ru*

*Debaryomyces hansenii* - это представитель «нетрадиционных» осмо- и галотолерантных дрожжей, обладающих высоким биотехнологическим потенциалом и используемых в пищевой промышленности. Молекулярно-биологические исследования *D.hansenii* и совершенствование его штаммов в прикладных целях сильно затруднены отсутствием эффективных методов манипуляции с его геномом *in vivo*. Мы разработали CRISPR/Cas систему для редактирования генома *D.hansenii* и показали ее эффективность на примере гена, кодирующего предполагаемый фермент биосинтеза аденина.

**Ключевые слова:** *Debaryomyces hansenii*, CRISPR, Cas9, редактирование генома

Метаболическая инженерия биосинтетических или биодеградирующих путей у организмов, служащих клеточными фабриками, требует сбалансированной продукции нескольких белков, включая чужеродные белки из других организмов. Заданный уровень экспрессии генов соответствующих белков достигается за счет изменения копий генов, изменения регуляторных областей генов, удаления или введения факторов транскрипции и т.п. Причем манипуляции проводятся как с плазмидными конструкциями, так и с участками генома организма, используемого в генетических модификациях. Целевые изменения участков генома требуют использования точных и эффективных методов геномной инженерии, основанных на использовании искусственных эндонуклеаз рестрикции или ферментов рекомбинации ДНК: «цинково-пальцевые» нуклеазы (Zinc finger nuclease), TALENS, системы Cre-loxP, мегануклеаз и системы CRISPR/Cas9. Искусственные эндонуклеазы служат ключевой частью бионанотехнологии редактирования генома. В настоящее время, наиболее хорошо разработана технология редактирования генома, основанная на бактериальной системе адаптивного ответа против чужеродной ДНК – CRISPR/Cas9.

Эффективные генетические инструменты для манипуляции с геномами разработаны для всех хорошо изученных модельных организмов-продуцентов, таких как *Escherichia coli* или *Saccharomyces cerevisiae*. Несмотря на простоту генетических модификаций дрожжи *S. cerevisiae* не удобны для производства гетерологичных белков, это связано с относительно низкой эффективностью их систем внеклеточной секреции белков и нежелательным гипергликозилированием секретируемых белков, которое часто инактивирует эти белки. Поэтому в последние годы растёт интерес к так называемым «нетрадиционным» дрожжам, которые имеют специфичные особенности метаболизма, позволяющие преодолеть ряд трудностей в продукции гетерологичных белков [4].

Одним из представителей «нетрадиционных» дрожжей является *Debaryomyces hansenii*. *D. hansenii* - это осмо- и галотолерантные дрожжи с высоким биотехнологическим потенциалом, особенно в пищевой промышленности. *D. hansenii* входит в состав заквасок, используемых при изготовлении колбасных изделий и сыров. С другой стороны, он один из организмов, вызывающих порчу продуктов. Фундаментальные исследования и практические приложения этих дрожжей очень ограничены из-за отсутствия эффективных методов для манипуляции с его ДНК [3, 2].

В литературе отсутствуют сообщения о разработке указанных выше технологий манипуляции с геномной ДНК *in vivo* для *D. hansenii* [2]. Одной из причин отсутствия этих методов являются отклонения от стандартного генетического кода у этих дрожжей. Так, кодон CTG обычно кодирует лейцин, однако, у *D.hansenii* он кодирует серин. Таким образом, актуальна проблема создания методов геномной инженерии *D. hansenii*, которые могут значительно ускорить его исследования и реализацию его биотехнологического потенциала.

Ранее нами были получены плазмиды, кодирующие улучшенные версии системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома *S. cerevisiae* [1]. С помощью технологии рекомбинационного клонирования собрана плаزمиды по типу all-in-one, кодирующая все необходимые компоненты системы CRISPR/Cas9, способные функционировать в *D.hansenii*. Эффективность полученной системы показана на примере гена DEHA2G13772gD. *hansenii*, который кодирует фермент, похожий на фосфорибозиламиноимидазолкарбоксилазу дрожжей *S.cerevisiae*. С помощью системы CRISPR/Cas9, нацеленной на этот ген удалось получить штаммы с красной



окраской, характерной для штаммов дрожжей с нарушенным биосинтезом аденина. Т7-эндонуклеазным методом показано, что участок гена DEHA2G13772g, содержащего протоспейсер к sgRNA, имеет мутации со сдвигом рамки считывания, которые подтверждены секвенированием. Таким образом, впервые получена CRISPR/Cas9 система, функционирующая в *D.hansenii* с помощью которой впервые показано участие гена DEHA2G13772g в пути биосинтеза аденина.

1. Впервые разработана CRISPR/Cas9 система для редактирования генома нетрадиционных дрожжей *Debaryomyces hansenii*, имеющих значение в пищевой промышленности. 2. Впервые показано участие гена DEHA2G13772g, кодирующего фермент, похожий на фосфорибозиламиноимидазолкарбокксилазу дрожжей *S.cerevisiae*, в метаболизме аденина у *D. hansenii*.

Литература: 1. Армянинова Д. К., Карпов Д. С. Модификация гена SpCas9 для усовершенствования CRISPR/Cas9 системы редактирования генома// Биотехнология: состояние и перспективы развития: тезисы IX международного конгресса (Москва, 20 – 22 февраля 2017 г.) – Москва, 2017. – Т.2 - С.376 – 379. 2. Allison Yaguchi, Dyllan Rives, Mark Blenner. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance, 2017, AIMS Microbiology, 3(2): 227-247. 3. Prista C, Michán C, Miranda IM, Ramos J. Yeast Primer: The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts, 2016, Article in Yeast, Volume 33, Issue 10, P. 523–533 4. Richard H. Baltz, Arnold L. Demain and Julian E. Davies. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC 20036-2904, p.766

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (Тема 0103-2014-0006 #58 Молекулярная генетика, механизмы реализации генетической информации, биоинженерия).

Литература:

1. Armyaninova D. K., Karpov D.S. Modification of SpCas9 for Improving the CRIPR/Cas9 Genome Editing System// IX International Congress Biotechnology: state of the art and perspectives (Moscow, 20-22 February, 2017) – Moscow, 2017 – V2 – P.376-379. 2. Allison Yaguchi, Dyllan Rives, Mark Blenner. New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance, 2017, AIMS Microbiology, 3(2): 227-247. 3. Prista C, Michán C, Miranda IM, Ramos J. Yeast Primer: The halotolerant *Debaryomyces hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts, 2016, Article in Yeast, Volume 33, Issue 10, P. 523–533 4. Richard H. Baltz, Arnold L. Demain and Julian E. Davies. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC 20036-2904, p.766

**Grant:** The work is supported by the Program of Basic Studies of Government Academies of Sciences in 2013–2020 (subject 0103-2014-0006 #58 ‘Molecular Genetics, Mechanisms of Genetic Information Realization and Bioengineering’)

UDC: 577.29.

## DEVELOPMENT OF CRISPR/CAS9 SYSTEM FOR GENOME EDITING IN DEBARYOMYCES HANSENI

D.Armyaninova <sup>1</sup>, .Karpov <sup>2</sup>, M.Kotlov <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya , 10/2

<sup>2</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Russia, 119991, Moscow, Vavilov , 32

*Debaryomyces hansenii* is a representative of non-conventional osmo- and halotolerant yeast, which has high biotechnological potential and is used in the food industry. Molecular biological studies of *D.hansenii* and the improvement of its strains for industrial applications sciences are greatly hampered by the lack of effective methods for manipulating its genome in vivo. We developed a CRISPR / Cas9 system for editing the genome of *D.hansenii* and showed its effectiveness using gene encoding putative enzyme of adenine biosynthetic pathway.

**Key words:** *Debaryomyces hansenii*, CRISPR, Cas9, genome editing

Metabolic engineering of biosynthetic or biodegradable pathways in organisms serving as cell factories requires the balanced production of several proteins, including foreign proteins from other organisms. The desired level of expression of the genes of the corresponding proteins is achieved by changing copies of genes, changing regulatory regions of genes, removing or introducing transcription factors, and so on. Moreover, manipulations involve both plasmid constructs and genome regions of the organism to be genetically modified. Targeted changes

in genome loci require the use of precise and effective genomic engineering methods based on artificial restriction endonucleases or DNA recombination enzymes: zinc finger nucleases, TALENS, Cre-loxP system, meganucleases and CRISPR/Cas systems. Artificial endonucleases are a key part of the biotechnology of editing the genome. Currently, the most well developed technology for genome editing is based on the bacterial system of adaptive response against foreign DNA – CRISPR/Cas9.

Effective genetic tools for manipulating genomes are developed for all well-studied model producer organisms, such as *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae*. Despite the simplicity of genetic modifications, yeast *S. cerevisiae* is not convenient for the production of heterologous proteins due to the relatively low efficiency of their extracellular protein secretion systems and the undesirable hyperglycosylation of secreted proteins, which often inactivates these proteins. Therefore, in recent years there has been growing interest in so-called "non-conventional" yeasts, which have specific metabolic peculiarities, which make it possible to overcome a number of difficulties in the production of heterologous proteins [4].

One of the representatives of non-conventional yeast is *Debaryomyces hansenii*. *D. hansenii* is osmo- and halotolerant yeast with high biotechnological potential, especially in the food industry. *D. hansenii* is a part of starter cultures used in the manufacture of sausages and cheeses. On the other hand, it is one of the organisms that cause food spoilage. Fundamental research and industrial applications of these yeasts are very limited due to the lack of effective methods for manipulating its DNA [3, 2].

There are no reports in the literature of the development of the above mentioned technologies for manipulation with genomic DNA *in vivo* for *D. hansenii* [2]. One of the reasons for the absence of these methods is deviations from the standard genetic code in these yeasts. So, the CTG codon usually encodes leucine, however, in *D. hansenii* it encodes serine. Thus, the actual problem is creation of methods for genomic engineering of *D. hansenii*, which can significantly accelerate its research and realization of its biotechnological potential.

Earlier we obtained plasmids encoding improved versions of the CRISPR/Cas9 system for editing the *S. cerevisiae* genome [1]. Using technology of recombinational cloning, we have assembled an all-in-one plasmid, encoding all the necessary components of the CRISPR/Cas9 system, capable of functioning in *D. hansenii*. The efficiency of the obtained system is demonstrated on the gene DEHA2G13772g *D. hansenii*, which encodes an enzyme similar to the yeast *S. cerevisiae* phosphoribosylaminoimidazole carboxylase. Using the CRISPR/Cas9 system targeted to this gene, we obtain strains with a red color, characteristic for yeast strains with impaired adenine biosynthesis. The T7 endonuclease method showed that the part of the gene DEHA2G13772g containing a protospacer for sgRNA has frame-shift mutations which are confirmed by sequencing. Thus, for the first time we have developed the CRISPR / Cas9 system, functioning in *D. hansenii*, and have shown that gene DEHA2G13772g participates in the adenine biosynthetic pathway.

1. For the first time, we have developed a CRISPR/Cas9 system for genome editing of the non-conventional yeast *Debaryomyces hansenii* important for food industry. 2. For the first time, we have shown that DEHA2G13772g encoding an enzyme similar to the yeast *S. cerevisiae* phosphoribosylaminoimidazole carboxylase in adenine biosynthesis.

#### References:

1. Armyaninova D. K., Karpov D.S. *Modification of SpCas9 for Improving the CRIPR/Cas9 Genome Editing System// IX International Congress Biotechnology: state of the art and perspectives (Moscow, 20-22 February, 2017) – Moscow, 2017 – V2 – P.376-379.*
2. Allison Yaguchi, Dyllan Rives, Mark Blenner. *New kids on the block: emerging oleaginous yeast of biotechnological importance, 2017, AIMS Microbiology, 3(2): 227-247.*
3. Prista C, Michán C, Miranda IM, Ramos J. *Yeast Primer: The halotolerant Debaryomyces hansenii, the Cinderella of non-conventional yeasts, 2016, Article in Yeast, Volume 33, Issue 10, P. 523–533*
4. Richard H. Baltz, Arnold L. Demain and Julian E. Davies. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, ASM Press, American Society for Microbiology, Washington, DC 20036-2904, p.766*

**Grant:** The work is supported by the Program of Basic Studies of Government Academies of Sciences in 2013–2020 (subject 0103-2014-0006 #58 'Molecular Genetics, Mechanisms of Genetic Information Realization and Bioengineering')

УДК: 577.112.083

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ СЕКЦИОННОГО И ПОЛУ-ВИРТУАЛЬНОГО ДВУМЕРНОГО ГЕЛЬ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ESI LC-MS/MS

 Е.С.Петренко<sup>1</sup>, С.Н.Нарыжный<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, Россия, 119121, Москва, Погодинская, 10, стр. 8, el.petrenko@bk.ru, +7 (967) 274 49 92

<sup>2</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Россия, 188300, Гатчина, Мкр. Орлова роща, 1, snaryzhny@mail.ru, +79111764453

Произведена количественная оценка результатов идентификации белков и их протеоформ в раковой линии HepG2, полученных с использованием ESI LC-MS/MS и с помощью секционного или полу-виртуального двумерного гель электрофореза (2DE). Показано, что полу-виртуальный 2DE позволяет при примерно одинаковом количестве обнаруженных уникальных генов / белков идентифицировать большее количество протеоформ, среди которых могут быть и формы характерные только для раковых клеток. Данный метод может быть использован для поиска специфических протеоформ характерных только для раковых заболеваний.

**Ключевые слова:** 2DE, протеомика, ESI LC-MS/MS, протеоформы, HepG2, IEF

Двумерный гель электрофорез (2DE) является одним из лучших подходов для разделения сложных белковых образцов. Вместе с масс-спектрометрическими методами крупномасштабной идентификации 2DE является эффективным инструментом протеомики. В данной работе было применено два варианта 2DE к изучению профиля раковой клеточной линии HepG2 – секционный и полу-виртуальный. Оба метода на начальных стадиях не имеют отличий, что позволяет количественно оценить полученные экспериментальные результаты.

Первым этапом является изоэлектрофокусирование белков лизата клеток HepG2 на IPG стрипах. На втором этапе - в первом случае разделение проводилось с помощью SDS-PAGE с дальнейшим секционным анализом геля с использованием ESI LC-MS/MS, а во втором SDS-PAGE заменялся ESI LC-MS/MS (полу-виртуальный 2DE).

Оказалось, что количество протеоформ, идентифицированных полу-виртуальным 2DE значительно выше, чем в случае секционного анализа. Для секционного анализа было обнаружено 22771 протеоформа кодируемая 3774 генами, а для полу-виртуального - 32682 протеоформы, кодируемые 3962 генами. Данная тенденция была подтверждена в нашей лаборатории с использованием нескольких других клеточных линий.

*Литература:*

1. Naryzhny S, Zgoda V, Kopylov A, Petrenko E, Archakov A. A semi-virtual two dimensional gel electrophoresis: IF-ESI LC-MS/MS // *MethodsX*. – 2017. – Vol. 4. P. 260-264  
 2. Naryzhny SN, Zgoda VG, Maynskova MA, Novikova SE, Ronzhina NL, Vakhrushev IV, Khryapova EV, Lisitsa AV, Tikhonova OV, Ponomarenko EA, Archakov AI. Combination of virtual and experimental 2DE together with ESI LC-MS/MS gives a clearer view about proteomes of human cells and plasma // *Electrophoresis*. – 2016. – Vol. 37(2). – P. 302-309  
 3. Naryzhny SN, Maynskova MA, Zgoda VG, Ronzhina NL, Kleyst OA, Vakhrushev IV, Archakov AI. Virtual-experimental 2DE approach in chromosome-centric human proteome project. *J Proteome Res*. – 2016. – Vol. 15(2). – P. 525 - 530

**Финансирование:** Электрофоретические и масс-спектрометрические работы выполнены с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» в ИБМХ, который поддерживается Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение 14.621.21.0017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017). Особенная благодарность В.Г.Згоде и А.Т.Копылову.

UDC 577.112.083

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RESULTS OF SECTIONAL AND SEMI-VIRTUAL TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS USING ESI LC-MS/MS

E.Petrenko <sup>1</sup>, S.Naryzhny <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> V.N.Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Russia, 119121, Moscow, Pogodinskaya, 10, b. 8

<sup>2</sup> Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Center "Kurchatov Institute", Russia, 183000, Gatchina, Mkr. Orlova Roshcha, 1

A quantitative evaluation of protein identification by ESI LC-MS / MS in cancer cell line HepG2 using a sectional or a semi-virtual two-dimensional gel electrophoresis (2DE) was performed. It was shown that a semi-virtual 2DE allows to detect an approximately same number of unique genes/proteins as the sectional 2DE but a greater number of proteoforms some of them could be characteristic for cancer cells. This method can be used to search for cancer specific proteoforms.

**Key words:** 2DE, proteomics, ESI LC-MS / MS, proteoforms, HepG2, IEF

Two-dimensional gel electrophoresis (2DE) is a type of separation of complex protein samples with a high resolution. Together with a large-scale identification method, like mass spectrometry, 2DE has long been the main tool of proteomics. In this work, two approaches to studying the profile of the cancer cell line HepG2 - sectional and semi-virtual, have been applied. Both methods in the initial stages have no differences, which makes it possible to compare the results obtained during the experiments.

The first stage was the isoelectric focusing of the extract of HepG2 cells in the IPG strips. In the second stage, in the first case, the separation was performed using SDS-PAGE with further sectional analysis of the gel using ESI LC-MS / MS, and in the second case, SDS-PAGE was replaced with ESI LC-MS / MS (semi-virtual 2DE).

The amount of proteoforms identified by a semi-virtual 2DE is much higher than in case of a sectional 2DE. In case of the sectional analysis, 22771 proteoforms encoded by 3774 genes were found, and 32682 proteoforms encoded for 3962 genes – in case of the semi-virtual 2DE. These results were also validated in our laboratory using several other cell lines.

### References:

1. Naryzhny S, Zgoda V, Kopylov A, Petrenko E, Archakov A. A semi-virtual two dimensional gel electrophoresis: IF-ESI LC-MS/MS // *MethodsX*. – 2017. – Vol. 4. P. 260-264
2. Naryzhny SN, Zgoda VG, Maynskova MA, Novikova SE, Ronzhina NL, Vakhrushev IV, Khryapova EV, Lisitsa AV, Tikhonova OV, Ponomarenko EA, Archakov AI. Combination of virtual and experimental 2DE together with ESI LC-MS/MS gives a clearer view about proteomes of human cells and plasma // *Electrophoresis*. – 2016. – Vol. 37(2). – P. 302-309
3. Naryzhny SN, Maynskova MA, Zgoda VG, Ronzhina NL, Kleyst OA, Vakhrushev IV, Archakov AI. Virtual-experimental 2DE approach in chromosome-centric human proteome project. *J Proteome Res*. - 2016. - Vol. 15(2). - P. 525 - 530

**Grant:** Mass spectrometric and electrophoretic studies were carried out using the equipment of «Human Proteome» Core Facility (IBMC, Moscow, Russia), supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (agreement 14.621.21.0017, unique project ID RFMEFI62117X0017). A special acknowledgment to V.G.Zgoda and A.T.Kopylov.

УДК 616.8-085.2/3

## ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ТЕСТ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПСИХИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Захарова Н.В.<sup>1,5</sup>, Низамутдинов И.И.<sup>2</sup>, Ильинский В.В.<sup>2</sup>, Резник А.М.<sup>3,5</sup>, Морозова А.Ю.<sup>4,5</sup>, Костюк Г.П.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, nataliza80@gmail.com

<sup>2</sup> ООО «Генотек», Москва

<sup>3</sup> Московский государственный университет пищевых производств, Москва

<sup>4</sup> ФГБУ "ФМИЦПН им. В.П. Сербского", Москва

<sup>5</sup> Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗМ, Москва

Первые фармакогенетические исследования эффективности и безопасности психотропных препаратов были сосредоточены на изучении роли генов, кодирующих цитохромы печени, задействованных в фармакокинетике антипсихотиков [Hwang R. et al., 2010; Zhang JP, et al., 2010; Vehof J. et al., 2012; Vehof J. et al., 2012; Brandl E.J. et al., 2014] и выполнялись в сходном дизайне, учитывающем корреляцию генотипа пациентов по единичным полиморфизмам с уровнем концентрации препарата в крови и его клиническим эффектом. На современном этапе стало очевидно, что учет небольшого количества генетических маркеров не всегда оказывается информативным и, следовательно, недостаточен для надежной персонализации психофармакотерапии.

Одним из самых современных методов генетических исследований является GWAS - полногеномное исследование ассоциаций, заключающееся в сравнении полных геномов различных групп пациентов. Такие исследования позволили обнаружить множество генетических маркеров, ассоциированных как с фармакокинетикой, так и фармакодинамикой психотропных препаратов.

Нами проведена разработка фармакогенетического теста для подбора психотропных препаратов и его апробация на 6 пациентах с психическими расстройствами, принимающих психотропные лекарственные препараты, с катамнезом 3-36 месяцев. Генетический анализ проводился с использованием биочипов высокой плотности компании Illumina (Illumina Inc, США). Интерпретация результатов генетического тестирования осуществлялась в компании ООО "Генотек" (Россия) на основании собственного алгоритма, основанного на информации базы данных PharmGKB (Whirl-Carrillo et al. 2012). При этом учитывались только те полиморфизмы, ассоциация которых с эффективностью, безопасностью, дозировкой и метаболизмом лекарственных средств, имела уровень доказательности не ниже 2B. В результате тестирования у пациентов были выявлены генетические маркеры, ассоциированные с эффективностью и побочными реакциями лекарственных препаратов, что совпадало с данными их катамнеза.

Применение данного фармакогенетического теста позволяет точнее предсказать реакцию организма на лечение психотропными препаратами, значительно снизить время на подбор оптимальной терапии и пребывание пациента в стационаре.

### Литература:

- Hwang R., Zai C., Tiwari A., M?ller D.J., Arranz M.J., Morris A.G. et al. Effect of dopamine D3 receptor gene polymorphisms and clozapine treatment response: exploratory analysis of nine polymorphisms and meta-analysis of the Ser9Gly variant. // *Pharmacogenomics J.* 2010. 10(3). — P. 200-18;
- Zhang JP, Lencz T, Malhotra AK. D2 receptor genetic variation and clinical response to antipsychotic drug treatment: a meta-analysis. // *Am J* 2010. 167(7). — P. 763-72;
- Vehof J., Burger H., Willfert B., Al Hadithy A., Alizadeh B.Z., Snieder H et al. Clinical response to antipsychotic drug treatment: association study of polymorphisms in six candidate genes. // *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012. 22(9). — P. 625-31
- Vehof J., Burger H., Willfert B., Al Hadithy A., Alizadeh B.Z., Snieder H et al. Clinical response to antipsychotic drug treatment: association study of polymorphisms in six candidate genes. // *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012. 22(9). — P. 625-31
- Brandl E.J., Kennedy J.L., Miller D.J. Pharmacogenetics of antipsychotics. // *Can J Psychiatry.* 2014. 59(2). — P. 76-88

UDC 616.8-085.2/3

## GWAS EFFICACY AND SAFETY PSYCHOPHARMACOTHERAPY

Zakharova N.V.,<sup>5</sup> Nizamutdinov I.I.<sup>1</sup>, Ilinsky V.V.<sup>2</sup>, Reznik A.M.<sup>3,5</sup>, Morozova A.Y.<sup>4,5</sup>, Kostyuk G.P.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, Russia

<sup>2</sup> Genotek Ltd., Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Medico Social Technology of the Moscow State University of Food Production

<sup>4</sup> Serbsky Federal Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Psychiatric Clinical Hospital 1 n. a. N.A. Alekseev of Healthcare Department of Moscow, Moscow, Russia

The first psychopharmacogenetic studies focused on the role of genes encoding liver cytochromes involved in the pharmacokinetics of antipsychotics [Hwang R. et al., 2010; Zhang JP, et al., 2010; Vehof J. et al., 2012; Vehof J. et al., 2012; Brandl E.J. et al., 2014] and performed in a similar design, taking into account the correlation of the patient's genotype by single polymorphisms with the level of drug concentration in the blood and its clinical effect. At the present stage, it became obvious that taking into account a small number of genetic markers is not always uninformative and, consequently, insufficient for the reliable personalization of psychopharmacotherapy.

One of the most modern methods of genetic diagnosis is GWAS, a full-genomic study of associations, including genome decoding and complex mathematical processing. We examined 6 patients with psychiatric disorders taking psychotropic medications) with a catamnesis of 3-36 months. Genetic analysis was performed using high density biochips from Illumina (Illumina Inc, USA). Interpretation of the results of genetic testing and pharmacogenetic analysis were carried out in the company "Genotek" (Russia) based on an algorithm that takes into account the associations of the PharmGKB database (Whirl-Carrillo et al., 2012) according to its own algorithms developed in 2017. The purpose of genetic research was the search for genetic markers that mediate the effectiveness and safety of psychopharmacotherapy. Preliminary results of the longest (up to 11 years) retrospective observation with convincing accuracy data of the psychopharmacogenetics of GWAS accuracy and safety of psychiatrists applied for the entire period of treatment were presented.

### References:

1. Hwang R., Zai C., Tiwari A., Miller D.J., Arranz M.J., Morris A.G. et al. Effect of dopamine D3 receptor gene polymorphisms and clozapine treatment response: exploratory analysis of nine polymorphisms and meta-analysis of the Ser9Gly variant. // *Pharmacogenomics J.* 2010. 10(3). — P. 200-18;
2. Zhang JP, Lencz T, Malhotra AK. D2 receptor genetic variation and clinical response to antipsychotic drug treatment: a meta-analysis. // *Am J* 2010. 167(7). — P. 763-72;
3. Vehof J., Burger H., Wilffert B., Al Hadithy A., Alizadeh B.Z., Snieder H et al. Clinical response to antipsychotic drug treatment: association study of polymorphisms in six candidate genes. // *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012. 22(9). — P. 625-31
4. Vehof J., Burger H., Wilffert B., Al Hadithy A., Alizadeh B.Z., Snieder H et al. Clinical response to antipsychotic drug treatment: association study of polymorphisms in six candidate genes. // *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012. 22(9). — P. 625-31
5. Brandl E.J., Kennedy J.L., Miller D.J. Pharmacogenetics of antipsychotics. // *Can J Psychiatry.* 2014. 59(2). — P. 76-88

УДК 577.151.35; 577.113.4, 577.2.08

## ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК: ИЗУЧЕНИЕ КИНЕТИКИ РЕАКЦИИ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ПОЛИМЕРАЗАМИ СЕМЕЙСТВ A И B.

Павлов А.С.<sup>1,2</sup>, Шершов В.Е.<sup>1</sup>, Кузнецова В.Е.<sup>1</sup>, Чудинов А.В.<sup>1,2</sup>, Лапа С.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия  
119991, Москва, ул. Вавилова, д.32

<sup>2</sup> ООО «ИБМХ-ЭкоБиоФарм», Москва, Россия  
119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8  
e-mail: lapa@biochip.ru

Изучено влияние заместителей различной химической природы по С5-положению пиримидинового цикла трифосфата дезоксиуридина на кинетику реакции при ферментативном получении модифицированных ДНК.

**Ключевые слова:** трифосфат дезоксиуридина, модифицированные нуклеотиды, модифицированные ДНК, ПЦР в реальном времени, эффективность амплификации.

Модифицированные ДНК играют важную роль при конструировании биосенсоров, ДНК-зондов и аптамеров для диагностики и терапии [1]. Ферментативный способ введения модификаций является наиболее универсальным, но требует решения проблемы субстратной совместимости модифицированных dNTP (mod-dNTP) с применяемыми полимеразы. В работе исследована субстратная эффективность шести mod-dUTP, содержащих фрагменты 3-метилбутановой, индолпропионовой, фенилпропионовой, н-бутановой, 5-метилгексановой, 4-гидроксибензилуксусной кислот (dU105, dU107, dU111, dU119, dU120, dU122, соответственно) [2]. Проводили ПЦР при полном замещении природного dTTP на каждый из mod-dUTP с ДНК-полимеразами Taq (семейство A) и Vent (exo-) (семейство B) для амплификации фрагмента бактериальной ДНК (*M. tuberculosis*) [3]. Выявлено влияние химической природы заместителей на степень ингибирования ПЦР, рассчитана эффективность амплификации «E» с применением методов а) порогового цикла и б) угла наклона прямого участка S-образной кривой амплификации (Рис. 1). Показано возрастание ингибирующего эффекта при увеличении концентрации mod-dUTP на примере производных, являющихся наиболее «плохими» субстратами для полимераз (Рис. 2). Определяли выход реакции по электрофореграмме (программа «ImageJ», NIH, США) и наличие полноразмерного продукта (Рис. 3). Выявлена зависимость подвижности продуктов ПЦР от модифицированного dUTP. Выявлена корреляция эффективности «E» и выхода целевого продукта. Оптимизация условий ПЦР позволила получить модифицированные ДНК для каждого mod-dUTP. Наибольшую эффективность показало применение ДНК-полимеразы Vent (exo-) с dU105 и dU119. Указанные соединения пригодны для ферментативного получения модифицированных ДНК, в том числе для отбора аптамеров методом SELEX.

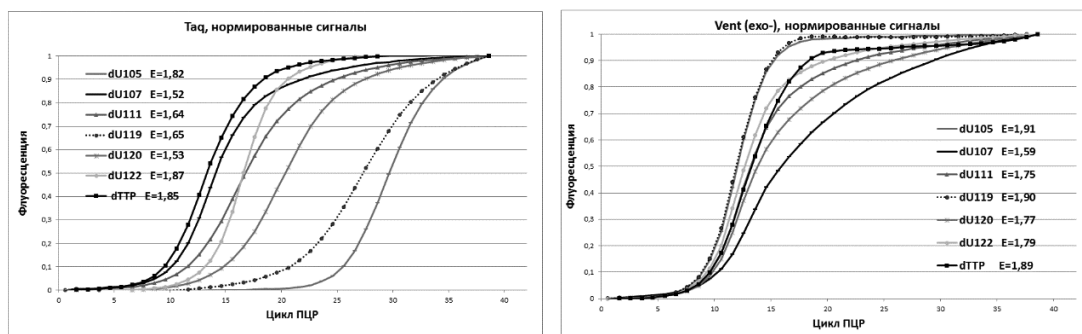


Рис. 1. ПЦР с mod-dUTP при полном замещении природного dTTP.

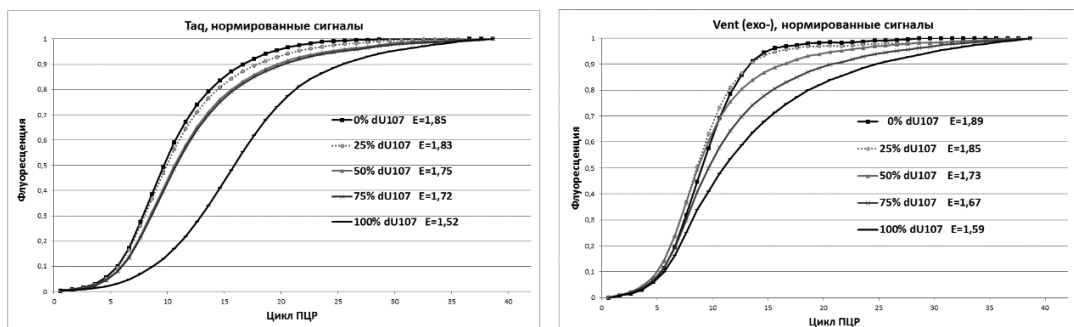


Рис. 2. Зависимость кинетики амплификации от концентрации mod-dUTP.

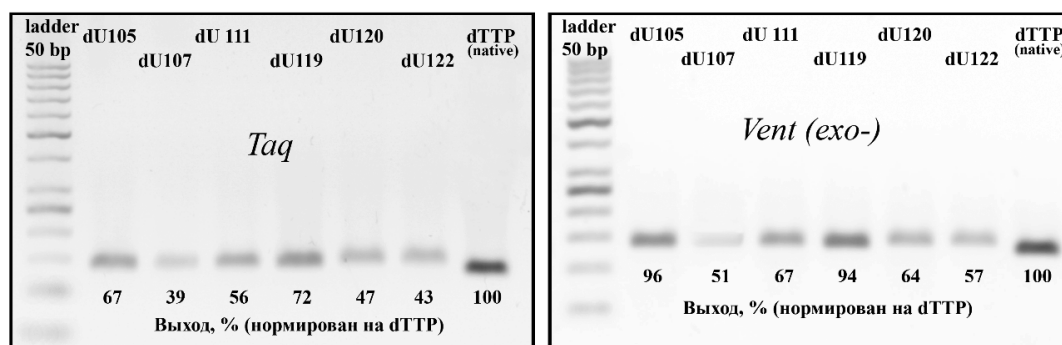


Рис. 3. Выход полноразмерного продукта ПЦР с mod-dUTP.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение №14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

Литература:

1. Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. *The Toolbox for Modified Aptamers* // *Mol Biotechnol.* – 2016. – №58. – С. 79-92.
2. Chudinov A.V., Kiseleva Y.Y., Kuznetsova V.E., et al. *Enzymatic synthesis of high-modified DNA* // *Mol Biol (Mosk).* – 2017. – №51. – С. 534-544.
3. Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, et al. *Identification of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips* // *J Clin Microbiol.* – 2001. – №39. – С. 2531-2540.

UDC 577.151.35; 577.113.4, 577.2.08

## ENZYMATIC PREPARATION OF MODIFIED DNA: STUDY OF THE REACTION KINETICS BY THE METHOD OF REAL-TIME PCR WITH POLYMERASES OF FAMILIES A AND B.

Pavlov A.S.<sup>1,2</sup>, Shershov V.E.<sup>1</sup>, Kuznetsova V.E.<sup>1</sup>, Chudinov A.V.<sup>1,2</sup>, Lapa S.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
 32, Vavilova st., Moscow, 119991, Russia

<sup>2</sup> IBMC-EcoBioPharm Ltd., Moscow, Russia  
 10/8, Pogodinskaya st., Moscow, 119121, Russia  
 e-mail: lapa@biochip.ru

The influence of substituents of different chemical nature in the C5-position of the pyrimidine cycle of deoxyuridine triphosphate on the reaction kinetics in enzymatic production of modified DNA was studied.

**Key words:** deoxyuridine triphosphate, modified nucleotides, modified DNA, real-time PCR, amplification efficiency.

Modified DNAs play an important role in the design of biosensors, DNA probes and aptamers for diagnostics and therapy [1]. Enzymatic method of incorporation of the modifications is the most universal, but it requires solving the problem of substrate compatibility of modified dNTPs (mod-dNTPs) with polymerases used. Here we report the investigation of the substrate efficiency of six mod-dUTPs, modified with fragments of 3-methylbutanoic, indolepropionic, fenilpropionic, n-butanoic, 5-methylhexanoic, 4-hydroxyphenylacetic acids (dU105, dU107, dU111, dU119, dU120, dU122, respectively) [2]. PCR was performed with complete substitution of natural dTTP to each of mod-dUTPs. Taq (family A) and Vent (exo-) (family B) DNA polymerases were used for amplification of bacterial DNA fragment (*M. tuberculosis*) [3]. The influence of the chemical nature of the substituents on the degree of PCR inhibition was revealed, the efficiency of amplification "E" was calculated using the methods of a) the threshold cycle and b) the angle of inclination of the straight section of the S-shaped amplification curve (Fig. 1). Increase of inhibitory effect at increase of mod-dUTP concentration is shown on the example of derivatives, which are the most "bad" substrates for polymerases (Fig. 2). The reaction yield and the presence of a full-size product were determined



by electrophoresis ("ImageJ" software, NIH, USA) (Fig. 3). The dependence of the mobility of PCR products from modified dUTP structure was revealed. The efficiency "E" and the the product yield correlate well. Optimization of PCR conditions allowed to obtain modified DNA for each of six mod-dUTPs. The most effective pares founded are: DNA polymerase Vent (exo-) with dU105 and dU119. These modified dUTPs are suitable for enzymatic production of modified DNA, including the selection of aptamers by SELEX.

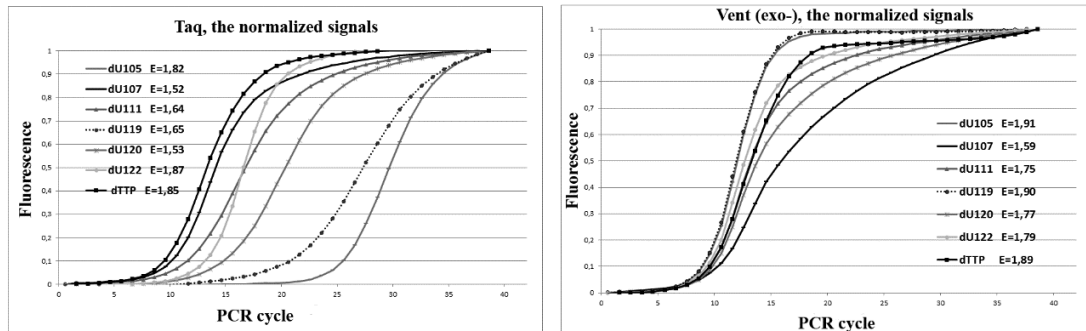


Fig. 1. PCR with full replacement of natural dTTP for each of mod-dUTPs.

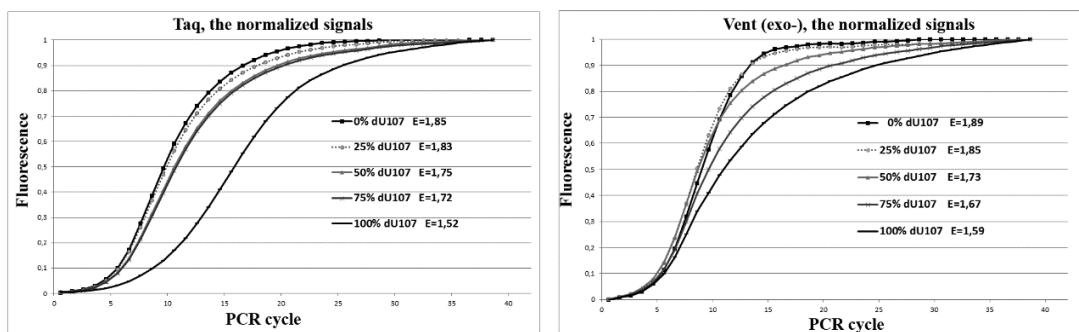


Fig. 2. The influence of the concentration of mod-dUTP on the kinetics of amplification.

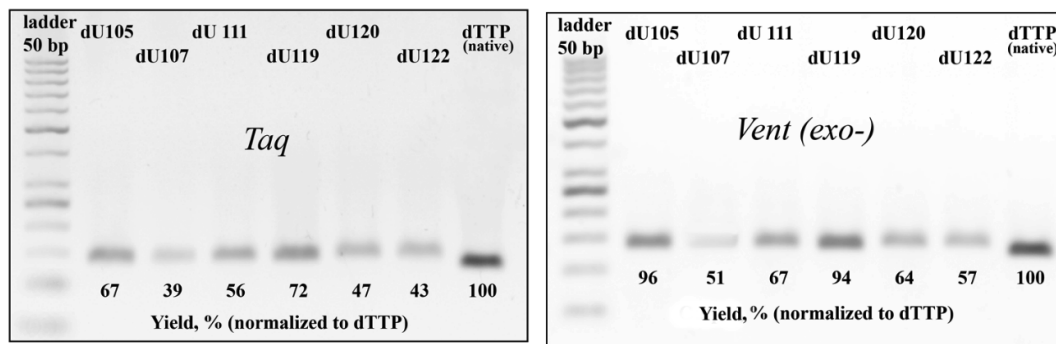


Fig. 3. The yield of the full-size products of PCR with mod-dUTPs.

The work was funded by Ministry of education and science of the Russian Federation (agreement No. 14.576.21.0096, the unique identifier of the project RFMEFI57617X0096).

References:

1. Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. The Toolbox for Modified Aptamers // *Mol Biotechnol.* – 2016. – №58. – С. 79-92.
2. Chudinov A.V., Kiseleva Y.Y., Kuznetsova V.E., et al. Enzymatic synthesis of high-modified DNA // *Mol Biol (Mosk).* – 2017. – №51. – С. 534-544.
3. Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, et al. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips // *J Clin Microbiol.* – 2001. – №39. – С. 2531-2540.

УДК 577.151

## ЧТО СКРЫВАЮТ САМЫЕ ИЗУЧАЕМЫЕ БЕЛКИ И МЕТАБОЛИТЫ?

**Ильгисонис Е.В., Лисица А.В.**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия  
119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8  
e-mail: [ilgisonis.ev@gmail.com](mailto:ilgisonis.ev@gmail.com)

Получены списки наиболее изученных белков и метаболитов, проведен анализ их функций, особенностей строения и задействованности в молекулярных и клеточных процессах.

**Ключевые слова:** протеомика, метаболомика, текст-майнинг

В 2017 году список наиболее изученных генов в биологии был опубликован в журнале Nature (<https://www.nature.com/articles/d41586-017-07291-9>). Этот список отражает важные тенденции в биомедицинских исследованиях, выявляя как проблемы, связанные с конкретными заболеваниями и проблемы общественного здравоохранения меняют приоритеты генетических исследований. База данных Pubmed дает прекрасную возможность провести подобные исследования для разных биологических объектов. В данной работе мы применили предложенный авторами вышеуказанной статьи алгоритм для выявления наиболее изученных белков и метаболитов, коррелируют ли они с наиболее изученными генами. Помимо это в данной работе мы пытались установить, есть ли прямая зависимость между уровнем экспрессии генов и их изученностью или нет?

Все описывающие белки человека публикации были извлечены из Pubmed в полуавтоматическом режиме. Перечень публикаций, описывающих метаболиты, были загружены с использованием базы данных PubChem: все соединения аннотируются списком статей, описывающих его. Взаимосвязи между белками и метаболитами устанавливались с использованием базы данных метаболитов человека (<http://www.hmdb.ca>). Для аннотации функции белков и метаболитов использовали генную онтологию и базу данных KEGG.

Сравнение количества статей, содержащих названиях всех человеческих белков показало, что список самых изучаемых белков не совпадает с аналогичным списком генов. Наиболее популярным белком является регулятор апоптоза Bcl-2, для которого экспериментально показана взаимосвязь с 3 метаболитами. Супрессор киназ Ras 2 описан примерно в 100 статьях, хотя он связан с более чем 1000 метаболитами. Кроме того, анализ помог нам выявить уникальные пары «белок-метаболит», которые можно использовать в мультиомиксных исследованиях, подразумевающих валидацию результатов протеомного анализа метаболомным.

Эта работа демонстрирует возможность использования автоматизированного анализа текстов публикаций для изучения биомедицинских тенденций и формирования научной гипотезы. Практическое использование полученных данных напрямую связано с возможностью прогнозирования научной продукции исследователей и научных групп, с одной стороны, и функциональной аннотации неизвестных белков (или других объектов), с другой. Этот подход может быть перенесен на другие биологические объекты для выявления научных тенденций и перспективных направлений исследований.

UDC 577.151

## WHAT IS BEHIND THE MOST STUDIED PROTEINS AND METABOLITES?

**E. Ilgisonis, A.V. Lisitsa**

V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry  
119121, Moscow, Pogodinskaya, 10/8  
e-mail: [ilgisonis.ev@gmail.com](mailto:ilgisonis.ev@gmail.com)

List of the most explored proteins and metabolites is obtained, their functions, structural peculiarities and involvement in molecular and cellular processes is analyzed.

**Key words:** proteomics, metabolomics, text-mining

In 2017 the list of the most studied genes in biology was published in the Nature journal (<https://www.>

nature.com/articles/d41586-017-07291-9). This list shows important trends in biomedical research, revealing how concerns over specific diseases or public-health issues have shifted research priorities towards underlying genes. The Pubmed database gives a marvelous opportunity to do this kind of research for different biological objects. We decided to take a look at this data from the other point of view. What are the most studied proteins and metabolites, do they correlate with the top-genes? Is there any correlation between gene expression and the number of researches devoted to the gene?

In semi-automatrical mode all the papers describing human proteins have been extracted from the Pubmed. Papers describing metabolites were uploaded using PubChem database: all the compounds are annotated with the list of articles, describing it. The relations between proteins and metabolites were estimated using the Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca>). For the protein and metabolite function annotation Gene Ontology and KEGG database were used.

Comparison of the papers number for all human proteins showed, that the most popular proteins are not the same that genes. The most popular protein is Apoptosis regulator Bcl-2 is associated with only 3 metabolites experimentally. Kinase suppressor of Ras 2 is described in about 100 papers, although it is associated with more than 1000 metabolites. Also, the analysis helped us to reveal unique pairs protein-metabolite which can be used in multiomics analysis (for example, validation of proteomic analysis using metabolomics).

This work shows the possibility of using of automated text-mining analysis of papers for studying biomedical trends and forming scientific hypothesis. Practical use of the data obtained is directly related to the possibility of predicting the scientific output of researchers and scientific groups at the one hand, and functional annotation of unknown proteins (or other objects), on the other. This approach can be transferred to other biological objects to reveal scientific trends and perspectives.

УДК: 579.222.3 ББК: 28.072

## SLYD-ДЕФИЦИТНЫЕ ШТАММЫ E.COLI КАК НОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ЭКСТРАКЦИИ БЕЛКОВ

**Е.А.Василенко, К.А.Кувалдина, Е.Н.Горшкова, И.В.Астраханцева, Д.В.Новиков, В.В.Мохонов**

*Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Россия, 603950, Нижний Новгород, проспект Гагарина, 23, kat802@rambler.ru, 89159486393*

В данном исследовании были получены четыре новых штамма E. coli с делецией генов бактериальных белков SlyD и SlyX, являющихся основными контаминирующими компонентами при экстракции рекомбинантных белков. SlyD/SlyX-мутантные штаммы позволяют увеличить чистоту белков сразу после аффинной хроматографии, исключая дополнительные процессы очистки.

**Ключевые слова:** штаммы E. coli, SlyD, SlyX, очистка белков, IMAC.

Одним из главных контаминирующих компонентов, наблюдаемых при экстракции рекомбинантных белков из бактериальных клеток и последующей очистке с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии (IMAC) является бактериальный белок SlyD. Высокое сродство SlyD к ионам металлов сохраняется даже при сильных денатурирующих условиях [1], поэтому полное его удаление является сложной задачей, приводящей к значительной потере целевого белка во время дополнительных процедур очистки. Целью данной работы являлось получение целевого белка без SlyD методом IMAC без дополнительных этапов очистки. Для достижения этой цели нуклеотидная последовательность SlyD/SlyX в геноме E.coli была удалена с помощью  $\lambda$ -red-хромосомной делеции и FLP-рекомбинаций [2]. Таким образом были модифицированы штаммы E. coli, такие как BL21 (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3) и B834 (DE3). В качестве целевого белка было выбрано рекомбинантное биспецифическое наноантитело MYSTI-2 (Myeloid-Specific TNF Inhibitor, специфический ингибитор TNF миелоидных клеток) [3]. Было оценено влияние нокаута SlyD/SlyX на биологические свойства целевого белка.

Очистку белков проводили с использованием Co<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии. Электрофоретический анализ образцов в ПААГ (SDS-PAGE) показал наличие SlyD, как дополнительной полосы размером около 19 кДа только в образцах белка, экспрессируемого штаммами E.coli «дикого типа», но не мутантными по SlyD/SlyX штаммами. Изменения уровня экспрессии MYSTI-2 между SlyD/SlyX-мутантными и штаммами «дикого типа» E. coli не наблюдалось.

Были оценены функциональные свойства полученного белка, чтобы определить, влияние нокаута SlyD/SlyX на фолдинг белка. TNF-связывающая активность MYSTI-2 была исследована методом ELISA. Существенной разницы в анти-TNF активности MYSTI-2, выделенного из SlyD/SlyX-мутантных или штаммов «дикого типа»,

обнаружено не было. Связывание MYSTI-2 и F4/80 было исследовано с помощью проточной цитометрии на макрофагах, полученных из костного мозга мышей, гуманизированных по гену TNF. Результаты подтвердили наличие специфического взаимодействия MYSTI-2, выделенного как из «диких», так и из SlyD/SlyX-мутантных штаммов E.coli, с F4/80 по сравнению с системным ингибитором TNF (STI-2).

Было показано, что удаление SlyD, предположительно обладающего свойствами шаперона, из экспрессионных штаммов E.coli не приводит к нарушению функциональной активности MYSTI-2. Использование новых  $\Delta$ SlyD/SlyX штаммов E.coli позволило нам решить проблему SlyD-контаминации и обеспечило успешную одностадийную очистку целевого белка в процессе одноэтапной очистки методом IMAC.

*Литература:*

1. Bolanos-Garcia V, Davies O. Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography//*Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol.1760. №9. P. 1304–13.
2. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. №12. P. 6640–5.
3. Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., et al. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. Vol. 113. №11. P. 3006–11.

**Финансирование:** Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания (№ 20.6156.2017/9.10, № 20.6445.2017/9.10, № 20.6159.2017/9.10), а также при поддержке РФФИ в рамках научных проектов №16-34-00561, № 17-04-01137, № 17-04-01478.

UDC 579.222.3 BBC 28.072

## **SLYD-DEFICIENT E.COLI STRAINS AS A NEW PLATFORM FOR PROTEIN EXTRACTION**

**E.Vasilenko, K.Kuvaldina, E.Gorshkova, I.Astrakhantseva, D.Novikov, V.Mokhonov**

*Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Russia, 603950, Nizhny Novgorod, Gagarin Av., 23*

In this study, four E. coli strains that lack the expression of SlyD as well as SlyX genes of bacterial proteins which contaminate the target recombinant proteins during their extraction were engineered. The SlyD/SlyX-deficient E. coli strains allow us to increase the purity of proteins immediately after immobilized metal affinity chromatography, and eliminate additional purification step.

**Key words:** E. coli strains, SlyD, SlyX, protein purification, IMAC

The most common contaminant of protein extraction from bacterial cells and IMAC purification is a protein SlyD. The high affinity of SlyD for metal ions is retained even under strong denaturing conditions [1]. Consequently, the complete removal of SlyD is a very difficult task, which leads to significant loss of recombinant protein during additional purification procedures. In this study, we aimed to obtain a SlyD-free target protein, immediately after IMAC, without any additional purification steps. To achieve this goal, the nucleotide sequence of SlyD/SlyX in the E. coli genome was removed using the  $\lambda$ -red chromosomal deletion strategy and FLP-recombinations [2]. Thus, strains of E. coli, such as BL21 (DE3), C41 (DE3), C43 (DE3) and B834 (DE3) have been modified. The recombinant bispecific nanoantibody MYSTI-2 (Myeloid-Specific TNF Inhibitor, a specific inhibitor of TNF of myeloid cells) was chosen as the target protein [3]. The effect of SlyD/SlyX knockout on the biological properties of the target protein was evaluated.

Protein purification was performed by using Co<sup>2+</sup>-affinity chromatography (TALON resin). SDS-PAGE analysis of purified proteins revealed the presence of SlyD as an additional band with a molecular weight of ~19 kDa in protein samples expressed by "wild-type" but not SlyD/SlyX-deficient strains E. coli. SDS-PAGE revealed no changes in the expression level of MYSTI-2 between SlyD/SlyX-deficient and "wild-type" E. coli strains.

In order to determine whether the SlyD/SlyX knockout leads to protein misfolding, we evaluated the functional properties of expressed protein. The potential of MYSTI-2 to bind to TNF was tested by ELISA. No significant difference was observed between the rates of hTNF interaction with MYSTI-2 isolated from  $\Delta$ SlyD/SlyX and wild type strains. Binding of the MYSTI-2 to F4/80 was tested by flow cytometry analysis on BMD-macrophages of TNF-humanized mice. The results confirmed a specific interaction of MYSTI-2 obtained from wild type as well as SlyD/SlyX deficient strains, with F4/80 in contrast to that of STI-2.

Thus, it has been shown that the removal of SlyD protein that has putative chaperone functions from E. coli does not lead to impair the functional activity of MYSTI-2. The usage of new  $\Delta$ SlyD/SlyX E. coli strains allowed us to overcome the problem of SlyD contamination and ensure a successful one-stage IMAC purification for the target protein.

References:

1. Bolanos-Garcia V., Davies O. *Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography*//*Biochim. Biophys. Acta.* 2006. Vol.1760. №9. P. 1304–13.
2. Datsenko K.A., Wanner B.L. *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. Vol. 97. №12. P. 6640–5.
3. Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., et al. *Cell-type–restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source*//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. Vol. 113. №11. P. 3006–11.

**Grant:** The research was carried out within the state assignment of Russian Ministry of Science and Education (№ 20.6156.2017/9.10, № 20.6445.2017/9.10, № 20.6159.2017/9.10), supported in part by RFBR (№16-34-00561, № 17-04-01137, № 17-04-01478).

# УМНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ: ВОЗМОЖНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ

## POTENTIALS OF SYNTHETIC BIOLOGY: SMART MATERIALS FOR DIAGNOSTICS AND THERAPEUTICS

1. ВЛИЯНИЕ ЗАРЯДА ЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ НА ВСТРАИВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННОГО ДЕЗОКСИУРИДИНА В ЦЕПЬ ДНК, СИНТЕЗИРУЕМУЮ ТАQ ПОЛИМЕРАЗОЙ, Заседателева О. А., Василисков В. А., Суржиков С. А., Кузнецова В. Е., Шершов В. Е., Гусейнов Т. О., Юрасов Р. А., Спицин М. А., Чудинов А. В. ....	92
EFFECT OF A CHARGE OF CYANINE DYE ON INCORPORATION OF FLUORESCENTLY LABELLED DEOXYURIDINE INTO DNA CHAIN SYNTHESIZED BY TAQ POLYMERASE, Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. ....	93
2. ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МЕМБРАННЫХ ЧАСТИЦ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА – ЭКЗСОМ И МИКРОВЕКЗИКУЛ НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ A549, Савиновская Ю.И., Савельева А.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Семенов Д.В. ....	94
THE INFLUENCE OF HUMAN BLOOD PLASMA MEMBRANE-COVERED VESICLES - EXOSOMES AND MICROPARTICLES ON LUNG ADENOCARCINOMA CELLS A549, Savinovskaya Yu.I., Savelyeva A.V., Kuligina E.V., Richter V.A., Semenov D.V. ....	95
3. ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ РЕПОРТЕРЫ ДЛЯ МИКРОАНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ, Франк Л.А., Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., Кудрявцев А.Н. ....	96
HIGH-SENSITIVE BIOLUMINESCENT REPORTERS ON THE BASE OF COELENTERAZINE-DEPENDENT LUCIFERASES, Frank L.A., Krasitskaya V.V., Bashmakova E.E., Kudryavtsev A.N. ....	97
4. ВЫЯВЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ СПОСОБОМ, Е.Е.Башмакова, В.В.Красицкая, Л.А.Франк ....	98
DETECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS BY BIOLUMINESCENCE METHOD, E.Bashmakova, V.Krasitskaya, L.Frank. ....	99
5. ПЕПТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (П-ФГО): СИНТЕЗ, ОЧИСТКА И ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ АНТИСМЫСЛОВЫХ АГЕНТОВ, Фокина А.А., МакКлори Г., Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Ильина А.М., Клабенкова К.В., Ван М., Арзуманов А.А., Гейт М.Дж., Фуджии М., Вуд М.Дж.А., Стеценко Д.А. ....	100
PEPTIDE CONJUGATES OF PHOSPHORYL GUANIDINE OLIGONUCLEOTIDES (P-PGO): SYNTHESIS, PURIFICATION AND APPLICATION AS ANTISENSE AGENTS, Fokina A.A., McClorey G., Chelobanov B.P., Burakova E.A., Ilyina A.M., Klabenkova K.V., Wang M., Arzumanov A.A., Gait M.J., Fujii M., Wood M.J.A., Stetsenko D.A. ....	101
6. ПРИМЕНЕНИЕ ЭМУЛЬСИОННОЙ ПЦР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫРОЖДЕННЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК С ВВЕДЕНИЕМ МОДИФИКАЦИЙ В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРООБЪЕМАХ, Лапа С.А., Ромашова К.С., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Чудинов А.В. ....	102
APPLICATION OF THE EMULSION PCR METHOD TO OBTAIN COMBINATORIAL DNA LIBRARIES USING INCORPORATION OF MODIFICATIONS IN ISOLATED MICROVOLUMES, Lapa S.A., Romashova K.S., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Chudinov A.V. ....	103

7. РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АНТИБИОТИКА ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ, Гендриксон О.Д., Шанин, И.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.....	104
DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR DETECTION OF ANTIBIOTIC CIPROFLOXACIN IN FOODSTUFFS, Hendrickson O.D., Shanin I.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.....	105
8. СОЗДАНИЕ НА ТВЕРДОЙ ФАЗЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СЛОЕВ, РЕАЛИЗУЮЩИХ БАЗОВЫЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ОПЕРАЦИИ, И ИХ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СПЕКТРАЛЬНО-ФАЗОВОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ, Пушкарев А.В., Орлов А.В., Мочалова Е.Н., Никитин М.П., Никитин П.И. ....	106
DEVELOPMENT OF MOLECULAR LOGIC-GATING BIOLAYERS ON SOLID PHASE AND THEIR INVESTIGATION BY SPECTRAL-PHASE INTERFEROMETRY, Pushkarev A.V., Orlov A.V., Mochalova E.N., Nikitin M.P., Nikitin P.I.....	107
9. СТРАТЕГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ, Кудрявцев И.В., Haley R. Pugsley, Sherree L. Friend .....	108
STRATEGIES OF QUANTITATIVE ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES FOR RESEARCHES IN THE FIELD OF ONCOLOGY BY IMAGING FLOW CYTOMETRY, Kudryavtsev I., Haley R. Pugsley, Sherree L. Friend .....	109
10. ТЕСТИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ: РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ МЕЛАФЕНА И ПРОИЗВОДНЫХ АНТИОКСИДАНТА ФЕНОЗАНА, НА МОДЕЛЯХ БИОМЕМБРАН - МУЛЬТИЛАМЕЛЛЯРНЫХ ЛИПОСОМАХ, Алексеева О.М., Ким Ю.А.....	110
STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES: THE PLANT GROWTH STIMULANT MELAFEN AND DERIVATIVES OF ANTIOXIDANT PHENOZAN, INFLUENCES TO MULTILAMELLAR LIPOSOMES AS THE MODELS OF BIOMEMBRANES, O.M. Alekseeva, Yu.A. Kim.....	111
11. N-(СУЛЬФОНИЛ)-ФОСФОРАМИДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ А НТИСМЫСЛОВЫЕ АГЕНТЫ, Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Прохорова Д.В., Захрямина А.Е., Ван М., Держалова А.Ш., Фокина А.А., Стеценко Д.А. ....	112
N-(SULFONYL)-PHOSPHORAMIDATE OLIGONUCLEOTIDES: NEW PROMISING ANTISENSE AGENTS, Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Zakhryamina A.E., Wang M., Derzhalova A.S., Fokina A.A., Stetsenko D.A. ....	113

УДК 577.2

## ВЛИЯНИЕ ЗАРЯДА ЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ НА ВСТРАИВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННОГО ДЕЗОКСИУРИДИНА В ЦЕПЬ ДНК, СИНТЕЗИРУЕМУЮ ТАQ ПОЛИМЕРАЗОЙ

**Заседателева О. А., Василюков В. А., Суржиков С. А., Кузнецова В. Е., Шершов В. Е., Гусейнов Т. О.,  
Юрасов Р. А., Спицин М. А., Чудинов А. В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия  
119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32  
e-mail: for\_lana3@mail.ru*

Установлено, что dUTPs, меченные электронейтральными цвиттерионными аналогами красителя Су3 или Су5, используются Таq полимеразой в ходе синтеза и амплификации ДНК более эффективно, чем dUTPs, меченные положительно заряженными аналогами красителя Су3 или Су5, и примерно на порядок эффективнее, чем Су3-или Су5-dUTP, заряд красителей которых отрицателен [1].

**Ключевые слова:** ферментативный синтез ДНК, флуоресцентное мечение.

Для изучения влияния суммарного заряда красителя на эффективность встраивания флуоресцентно меченных дезоксиуридинов, нами были синтезированы восемь производных dUTP, конъюгированных аналогами красителя Су3 или Су5, несущими различные заряды. Эти флуоресцентно меченные dUTPs, а также коммерческие Су3-dUTP и Су5-dUTP, были исследованы в полимеразных цепных реакциях и в реакциях удлинения праймера с использованием Таq полимеразы и олигонуклеотидной матрицы, содержащей один, два и три подряд расположенных аденина. С помощью флуоресцентных измерений были определены и проанализированы от-

носительные количества амплифицированной ДНК. dUTPs, меченные электронейтральными цвиттерионными аналогами красителя Cy3 или Cy5, использовались Taq полимеразой более эффективно, чем dUTPs, меченные положительно заряженными аналогами красителя Cy3 или Cy5, и примерно на порядок эффективнее, чем dUTPs, меченные отрицательно заряженными аналогами красителя Cy3 или Cy5 [1]. Эффективность использования Taq полимеразой минорных количеств (5%) dUTPs, меченных электронейтральными, положительно или отрицательно заряженными аналогами красителей Cy3 или Cy5 в ходе ПЦР составила 20-75%, 20-30% и 2-4%, соответственно [1]. Эффективность использования Taq полимеразой dUTPs, меченных электронейтральными, положительно или отрицательно заряженными аналогами Cy3 или Cy5, в ходе реакции удлинения праймера, в отсутствие dTTP в реакционных смесях, составила 50-100%, 30-40% и 0-6%, соответственно [1]. Полученные результаты могут быть использованы для повышения эффективности мечения и гибридизационного анализа ДНК в медицинской диагностике и для дизайна новых модифицированных аптамеров. Это исследование было выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда [номер гранта 14-14-01090].

#### Литература:

1. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. dUTPs conjugated with zwitterionic Cy3 or Cy5 fluorophore analogues are effective substrates for DNA amplification and labelling by Taq polymerase // *Nucleic Acids Research*. – 2018 Apr 10. doi: 10.1093/nar/gky247 [Epub ahead of print]

UDC 577.2

## EFFECT OF A CHARGE OF CYANINE DYE ON INCORPORATION OF FLUORESCENTLY LABELLED DEOXYURIDINE INTO DNA CHAIN SYNTHESIZED BY TAQ POLYMERASE

Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V.

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (EIMB RAS), Moscow, Russia  
32 Vavilov Street, 119991 Moscow, Russia  
e-mail: for\_lana3@mail.ru

It was found that dUTPs labelled with electroneutral zwitterionic Cy3 or Cy5 dye analogues are used by Taq polymerase in DNA synthesis and amplification more effectively than dUTPs labelled with positively charged Cy3 or Cy5 dye analogues, and approximately one order of magnitude more effectively than Cy3- or Cy5-dUTP the charge of dye of which is negative [1].

**Key words:** enzymatic DNA synthesis, fluorescent labelling.

To study the effect of a total charge of a dye on the efficiency of incorporation of fluorescently labelled deoxyuridines, we synthesized eight dUTP derivatives conjugated with Cy3 or Cy5 dye analogues carrying different charges. These fluorescently labeled dUTPs as well as commercial Cy3-dUTP and Cy5-dUTP were studied in polymerase chain reactions and in primer extension reactions using Taq polymerase and oligonucleotide template containing one, two and three adjacent adenine nucleotides. Using fluorescent measurements we estimated and analyzed the relative amounts of amplified DNA. dUTPs labeled with electroneutral zwitterionic Cy3 or Cy5 dye analogues were used by Taq polymerase more effectively than dUTPs labelled with positively charged Cy3 or Cy5 dye analogues, and approximately one order of magnitude more effectively than dUTPs labelled with negatively charged Cy3 or Cy5 dye analogues [1]. The efficiency of Taq polymerase using minor amounts (5%) of dUTPs labeled with electroneutral, positively or negatively charged Cy3 or Cy5 dye analogues in PCR was 20-75%, 20-30% and 2-4%, respectively [1]. The efficiency of Taq polymerase using dUTPs labeled with electroneutral, positively or negatively charged Cy3 or Cy5 dye analogues in primer extension reaction, in the absence of dTTP in reaction mixtures, was 50-100%, 30-40% and 0-6%, respectively [1]. The obtained results can be used to improve the efficiency of DNA labelling and hybridization analysis in medical diagnostics and for design of new modified aptamers. This study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation [grant number 14-14-01090].

#### References:

1. Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. dUTPs conjugated with zwitterionic Cy3 or Cy5 fluorophore analogues are effective substrates for DNA amplification and labelling by Taq polymerase // *Nucleic Acids Research*. – 2018 Apr 10. doi: 10.1093/nar/gky247 [Epub ahead of print]



УДК 577.29

## ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МЕМБРАННЫХ ЧАСТИЦ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА – ЭКЗОСОМ И МИКРОВЕЗИКУЛ НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ A549

Савиновская Ю.И.\*, Савельева А.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Семенов Д.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, ул. ак. Лаврентьева 8  
\*e-mail: yulya\_savinovskaya@mail.ru

Получены препараты мембранных частиц крови человека. Методом высокоэффективного секвенирования РНК на платформе Illumina HiSeq 1500 исследовано изменение экспрессии генов в клетках аденокарциномы легких A549 под действием мембранных частиц крови человека.

**Ключевые слова:** мембранные частицы крови человека, высокоэффективное секвенирование, экспрессия генов, клетки аденокарциномы легких человека A549.

Экзосомы и микровезикулы – внеклеточные мембранные структуры диаметром 30 - 100 нанометров (экзосомы) и > 100 нм (микровезикулы), секретируемые в межклеточное пространство клетками различных тканей и органов. Экзосомы и микровезикулы содержат липиды, белки, нуклеиновые кислоты - РНК и ДНК. Мембранные микро- и наночастицы обнаружены в различных жидкостях организма, таких как плазма и сыворотка крови, спинномозговая жидкость, а также в моче, слюне и молоке человека. В многообразии функций циркулирующих мембранных частиц выделяют участие в секреции белков, регуляцию процессов иммунного ответа и, в целом, процессов межклеточной коммуникации. В настоящее время анализ состава и структуры внеклеточных мембранных частиц рассматривают в качестве одного из самых перспективных направлений для диагностики, а методы модификации состава частиц - для терапии заболеваний человека.

Целью данной работы является анализ влияния мембранных микро- и наночастиц крови здоровых доноров на жизнеспособность и пролиферацию клеток аденокарциномы легких человека линии A549.

Для выделения и очистки мембранных микро- и наночастиц крови человека мы использовали метод дробного центрифугирования, включающий ультрацентрифугирование и серию переосаждений частиц при усилиях > 100 000g.

Жизнеспособность клеток аденокарциномы легких A549 инкубированных в присутствии мембранных частиц крови здоровых доноров анализировали методом МТТ-теста. Было показано, что препараты мембранных частиц крови здоровых доноров повышают жизнеспособность и метаболическую активность клеток человека через 48 ( $p < 0.05$ ) и 72 ( $p < 0.001$ ) ч инкубации. Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что мембранные частицы крови не вызывают апоптотических изменений мембран клеток A549 и не оказывают существенного влияния на пролиферацию.

С использованием метода высокоэффективного секвенирования проведен детальный анализ изменений транскриптома клеток аденокарциномы A549 под действием мембранных частиц крови человека. Для этого проводили выделение polyA РНК из контрольных клеток и клеток, инкубированных в среде с мембранными частицами крови, конструировали кДНК-библиотеки и секвенировали ДНК на станции Illumina HiSeq 1500 (ЗАО "Геноаналитика", Москва).

Установлено, что инкубация клеток A549 с препаратами мембранных частиц крови здоровых доноров в течение 6 ч приводит к изменению экспрессии генов из групп сигнальных каскадов цитокинов с участием NF-карра-В p100. Инкубация клеток A549 с мембранными частицами в течение 12 ч приводит к изменению экспрессии тех же групп генов, которые выявлены для 6 ч инкубации.

Полученные данные позволяют заключить, что мембранные частицы крови взаимодействуя с клетками A549 на начальном этапе (6 ч), модулируют NF-карра-В сигнальные каскады, которые в свою очередь, вызывают масштабные изменения экспрессии генов, репликации и репарации ДНК, сегрегации хроматина и других процессов, связанных с митозом к 24 ч инкубации клеток в среде с частицами.

Результаты могут быть использованы для создания новых средств диагностики и терапии заболеваний с использованием мембранных структур - экзосом и микровезикул крови человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-04-01457.

UDC 577.29

## THE INFLUENCE OF HUMAN BLOOD PLASMA MEMBRANE-COVERED VESICLES - EXOSOMES AND MICROPARTICLES ON LUNG ADENOCARCINOMA CELLS A549

Savinovskaya Yu.I.\*, Savelyeva A.V., Kuligina E.V., Richter V.A., Semenov D.V.

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, pr.*

*Lavrentieva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

*\*e-mail: yulya\_savinovskaya@mail.ru*

Purified preparations were obtained of membrane particles of human blood. By method of high - throughput RNA sequencing on the Illumina HiSeq 1500 platform was study the change in expression of human lungs adenocarcinoma A549 cells genes under the influence of human blood membrane particles.

**Key words:** membrane human blood particles, high- throughput sequencing, gene expression, lungs adenocarcinoma A549 cells.

Exosomes and microvesicles are extracellular membrane structures with a diameter of 30 to 100 nanometers (exosomes) and > 100 nm (microvesicles) secreted into the intercellular space by cells of various tissues and organs. Exosomes and microvesicles contain lipids, proteins, nucleic acids - RNA and DNA. Membrane micro- and nanoparticles are found in various body fluids, such as plasma and blood serum, cerebrospinal fluid, as well as in urine, saliva and human milk. In the variety of functions of circulating membrane particles are allocate the participation in the secretion of proteins, the regulation of the processes of the immune response and, in general, the processes of intercellular communication. At present, analysis of the composition and structure of extracellular membrane particles is considered as one of the most promising directions for diagnosis, and methods modifications the composition of particles - for the therapy of human diseases.

The purpose of this work was analysis the effect of membrane micro- and nanoparticles blood of healthy donors on the viability and proliferation of human lungs adenocarcinoma of the A549 cell line.

For isolation and purification of membrane micro- and nanoparticles of human blood, we used the method of fractional centrifugation, which includes ultracentrifugation and a series of reprecipitation of particles with forces > 100 000g.

The viability of lung adenocarcinoma A549 cells incubated in the presence of membrane blood particles from healthy donors was analyzed by the MTT test method. It was shown that preparations of membrane blood particles of healthy donors increase the viability of A549 cells and cellular metabolic activity at 48 (p <0.05) and 72 (p <0.001) hours of incubation. The flow cytometry method revealed that the membrane blood particles do not cause apoptotic changes in A549 cell membranes and do not have a significant effect on proliferation.

Using the method of high- throughput sequencing, a detailed analysis was conducted of changes in the transcriptome of human lung adenocarcinoma A549 cells under the action of human blood membrane particles. For this purpose, polyA RNA was isolated from control cells and cells incubated in medium with membrane blood particles, cDNA libraries were constructed and DNA was sequenced at Illumina HiSeq 1500 station (ZAO "Genoanalytica", Moscow).

It was established that the incubation of A549 cells with preparations of membrane blood particles of healthy donors within 6 hours leads to a change in the expression of genes from groups of cytokine signaling cascades involving NF-kappa-B p100. Incubation of A549 cells with membrane particles during 12 h results in a change in the expression of the same gene groups that were detected for 6 h of incubation.

The obtained data allow us to conclude that the membrane blood particles interacting with the A549 cells at the initial stage (6 h) modulate NF-kappa-B signaling cascades, which, in turn, cause large-scale changes in gene expression, DNA replication and repair, chromatin segregation, and other processes associated with mitosis to 24 hours of incubation of cells in a medium with particles.

The results can be used to create new means of diagnostic and therapy of diseases using membrane structures - exosomes and microvesicles of human blood.

This work was supported by grant of Russian Foundation for Basic Research grant number 16-04-01457.

УДК 577.322

## ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ РЕПОРТЕРЫ ДЛЯ МИКРОАНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ЦЕЛЕНТЕРАЗИН-ЗАВИСИМЫХ ЛЮЦИФЕРАЗ

Франк Л.А., Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., Кудрявцев А.Н.

Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Красноярск, Россия, 660036 Красноярск, Академгородок, 50/50  
 e-mail: lfrank@yandex.ru

Биолюминесцентная реакция целентеразин-зависимых белков – Ca<sup>2+</sup>-регулируемых фотопротейнов и люцифераз, протекает с высоким квантовым выходом. Биоспецифические метки на их основе, полученные химическим конъюгированием либо генетическим фьюзингом, обеспечивают простое и быстрое выявление мишени с высокой чувствительностью.

**Ключевые слова:** фотопротейн, люцифераза, молекулярный микроанализ

Ca<sup>2+</sup>-регулируемый фотопротейн обелин гидроидного полипа *Obelia longissima* – это стабильный нековалентный комплекс одноцепочечного полипепида (22,2 кДа) и предокисленного субстрата – пероксицелентеразина. Присоединение Ca<sup>2+</sup> вызывает декарбоксилирование целентеразина и сопровождается излучением кванта света ( $\lambda_{\text{max}} = 482$  нм). Ген, кодирующий апо-обелин, клонирован и получены рекомбинантный белок дикого типа, семейство его генетических вариантов с улучшенными свойствами, а также биоспецифические гибриды. Разработанным сайт-направленным синтезом с высоким выходом получают биолюминесцентные метки – конъюгаты обелина с биоспецифическими белками и олигонуклеотидами.

Применение обелиновых меток в биолюминесцентном иммуноанализе тиреотропного гормона, гормонов щитовидной железы и других мишеней в клинических сыворотках показало их конкурентоспособность по отношению к колориметрическим и радиоизотопным меткам [1].

На основе мутантов обелина с разными характеристиками биолюминесцентного сигнала создан метод одновременного выявления двух мишеней в одном образце. Подход использовали для одновременного выявления двух диагностически связанных гормонов, двух форм одного гормона, аллелей гена при SNP-генотипировании [2].

Люцифераза мягкого коралла *Renilla muelleri* катализирует окисление целентеразина молекулярным кислородом с испусканием света по классической ферментативной кинетике. Термостабильный вариант этой люциферазы (Rm7) с увеличенным квантовым выходом реакции был получен сайт-направленным мутагенезом. В связи с нестабильностью его, как и других люцифераз, при химическом конъюгировании с другими молекулами, биоспецифические метки на основе люциферазы Rm7 получали генетическим фьюзингом. Примером такого гибрида является белок 14D5a-Rm7, обладающий высокой аффинностью к поверхностному вирионному белку E вируса клещевого энцефалита (миниантитело 14D5a) и биолюминесцентным сигналом (люцифераза Rm7), полученный совместно с коллегами из ИХБифМ СО РАН (Новосибирск) [3]. На основе этого белка как репортера был разработан и испытан в течение сезонов 2016-2017 гг. биолюминесцентный иммуноанализ вируса клещевого энцефалита в клещах. Показано, что по чувствительности анализа (89,5%) и его специфичности (98,9%) предложенный способ не уступает иммуноанализу на основе колориметрической детекции, а также методу на основе ОТ-ПЦР, и при этом он существенно проще в исполнении [4].

Литература:

1. Frank L.A. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters// *Sensors*, 2010, Vol. 10, P. 11287-11300.
2. Frank L.A., Creation of artificial luciferases to expand their analytical potential// *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2015, Vol. 18, P. 919-929.
3. Burakova L.P., Kudryavtsev A.N., Stepanyuk G.A., Baykov I.K., Morozova V.V., Tikunova N.V., Dubova M.A., Lyapustin V.N., Yakimenko V.V., Frank L.A. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay// *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, Vol. 407, No. 18, P. 5417-5423.
4. Kudryavtsev A.N., Burakova L.P., Frank L.A. Bioluminescent detection of tick-borne encephalitis virus in native ticks// *Anal. Methods*, 2017, Vol. 9, P. 2252-2255.

UDC 577.322

## HIGH-SENSITIVE BIOLUMINESCENT REPORTERS ON THE BASE OF COELENTERAZINE-DEPENDENT LUCIFERASES

Frank L.A., Krasitskaya V.V., Bashmakova E.E., Kudryavtsev A.N.

Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS" Krasnoyarsk, Akademgorodok 50/50, 660036, Russia  
e-mail: lfrank@yandex.ru

Bioluminescence of coelenterazine-dependent proteins – Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins and luciferases proceeds with a high quantum yield. Biospecific labels on the base of proteins that were obtained chemically or by genetic fusing provide simple and fast detection of the target of interest with high sensitivity.

**Key words:** photoprotein, luciferase, molecular microassay

Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin of the hydroid *Obelia longissima* is a stable noncovalent complex of single-chain polypeptide (22.2 kDa), and pre-oxidized substrate – peroxycoelenterazine. Binding of Ca<sup>2+</sup> causes coelenterazine decarboxylation with the emission of light ( $\lambda_{\max} = 482$  nm). The cDNA of obelin was cloned; a recombinant protein of the wild type and a big group of its genetic variants with new useful properties, as well as biospecific hybrid proteins were obtained. The developed site-directed synthesis of obelin conjugates with proteins, haptens, or oligonucleotides provided bioluminescent labels for microassay. Bioluminescent immunoassay of thyroid-stimulating hormone, thyroid hormones and a number of other targets in clinical samples proved obelin labels to be competitive with colorimetric or radioisotopic ones [1].

The approach to simultaneously detect two targets in one sample was developed based on obelin variants with sharply different bioluminescence. The assay was applied for simultaneous detection of two hormones, two forms of one hormone, and gene alleles at SNP genotyping [2].

As opposed to photoprotein, the luciferase of the soft corral *Renilla muelleri* catalyzes coelenterazine oxidation with O<sub>2</sub> and light emission in accord with classical enzyme kinetics. The luciferase thermostable variant (Rm7) with the improved quantum yield was created. Due to the protein instability to chemical modifications the biospecific derivatives of the luciferase were obtained via genetic fusing. In cooperation with the colleagues from ICBFM SB RAS (Novosibirsk) a hybrid 14D5a-Rm7 was obtained [3]. It contains single-chain variable fragment of murine immunoglobulin 14D5a to the tick-borne encephalitis virus as a recognition element and Rm7 as a signal element. Both domains were shown to reveal their specific biological properties. The protein was applied as a label for solid-phase immunoassay of the virus in model samples and native ticks (about one thousand) [4]. The bioluminescent assay demonstrates high sensitivity close to that of the conventional RTq-PCR method but is essentially simpler; it is much faster than the colorimetric one – the signal is measured within 10 s, no stop-reaction is needed.

### References:

1. Frank L.A. Ca<sup>2+</sup>-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters// *Sensors*, 2010, Vol., 10, P. 11287-11300.
2. Frank L.A. Creation of artificial luciferases to expand their analytical potential// *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2015, Vol. 18, P. 919-929.
3. Burakova L.P., Kudryavtsev A.N., Stepanyuk G.A., Baykov I.K., Morozova V.V., Tikunova N.V., Dubova M.A., Lyapustin V.N., Yakimenko V.V., Frank L.A. Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay// *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015. Vol. 407, No. 18, P. 5417-5423.
4. Kudryavtsev A.N., Burakova L.P., Frank L.A. Bioluminescent detection of tick-borne encephalitis virus in native ticks// *Anal. Methods*, 2017, Vol. 9, P. 2252-2255.

УДК: 577.322

## ВЫЯВЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ СПОСОБОМ

**Е.Е.Башмакова, В.В.Красицкая, Л.А.Франк**

Институт биофизики СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50, jeun\_a@bk.ru, 8(391)2494430

Разработан способ выявления однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) на основе реакции удлинения специфических праймеров с последующей биолюминесцентной детекцией ее продуктов. Приведены примеры успешного применения способа при выявлении SNP, связанных с угрозой развития ряда заболеваний.

**Ключевые слова:** цветные варианты Ca<sup>2+</sup>-регулируемого фотопротейна обелина, однонуклеотидные полиморфизмы

Для идентификации

однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) разработан метод на основе реакции удлинения аллель-специфического праймера (PEXT) с последующим одновременным биолюминесцентным анализом ее продуктов. Анализ проводится в планшетном формате и занимает около 2 ч. Сигнальными элементами этого анализа являются цветные варианты фотопротейна обелина: фиолетовый, с заменами W92F,H22E,D12C, испускающий быстрый ( $k_d = 0,6$  с<sup>-1</sup>), сдвинутый в коротковолновую область сигнал ( $\lambda_{max} = 387$  нм) и зеленый, с заменой Y138F,A6C с медленным ( $k_d = 6,1$  с<sup>-1</sup>), смещенным в длинноволновую область сигналом ( $\lambda_{max} = 493$  нм).

С помощью сайт-специфического конъюгирования получены конъюгаты обелинов: фиолетовый обелин с олиготимидилатом (W92F,H22E,D12C – dT30) и зеленый обелин с антителами к флуоресцеину (Y138F,A6C – antiFAM).

Полученные конъюгаты использовали для выявления ряда полиморфизмов как одного гена, так и генов, локализованных на разных хромосомах, ассоциированных с риском развития различных патологий [1-3].

В содружестве с сотрудниками Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. Крыжановского проведено исследование распространенности мутаций R151C, R160W и D294H в гене меланокортинового рецептора первого типа, ассоциированных с риском развития меланомы среди населения Красноярского края. Исследованы образцы ДНК 174 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом меланомы кожи и 200 образцов ДНК здоровых доноров. Все результаты биолюминесцентного анализа подтверждены прямым секвенированием.

Предложенный способ использовали для одновременного определения SNP в генах CAT, NCL, HSPA1L и PCDH15, предположительно ассоциированных с угрозой возникновения нейросенсорной тугоухости у 288 рабочих цеха машиностроительного завода АО «Красмаш». Исследование по взаимосвязи риска нарушения слуха с данными полиморфизмами проводили совместно с сотрудниками Федерального сибирского научно-клинического центра ФМБА России.

Все матрицы получали одновременно с помощью мультиплексной ПЦР. Для контроля за корректным ходом анализа был сконструирован и получен положительный контрольный образец плазмидной ДНК, содержащий полиморфные участки всех исследуемых генов.

Разработанный нами способ выявления аллельных вариантов гена позволяет быстро и с высокой достоверностью проводить исследования, направленные на определение персональных генетических особенностей пациентов.

Литература:

1. Башмакова Е.Е., Красицкая В.В., Бондарь А.А., Козлова А.В., Рукша Т.Г., Франк Л.А. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (R160W, R151C, D294H) в гене рецептора меланокортина-1 (MC1R) биолюминесцентным анализом // Молекулярная биология. – 2015. – Т.49, № 6 – С.953-958.
2. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Frank L.A. Simultaneous genotyping of four single nucleotide polymorphisms associated with risk factors of hemostasis disorders // Journal of Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2015. – V. 18, N. 10, P. 930-937.
3. Krasitskaya, V.V., Kudryavtsev A. N., Shimomura O., Frank L.A. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay // Anal. Methods. – 2013. – N. 5. – P. 636-640.

UDC 577.322

## DETECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS BY BIOLUMINESCENCE METHOD

E. Bashmakova, V. Krasitskaya, L. Frank

Institute of Biophysics SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS", Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/50

A method to determine single nucleotide polymorphisms (SNPs) based on the extension of specific primers followed by bioluminescent assay of the reaction products was developed. Application of the method was successfully exemplified by the detection of SNPs associated with the threat of development of a series of diseases.

**Key words:** color variants of Ca<sup>2+</sup>-regulated photoprotein obelin, single nucleotide polymorphisms

To identify single nucleotide polymorphisms (SNPs), a method based on the extension of allele-specific primer (PEXT) followed by a simultaneous bioluminescent analysis of its products was developed. The analysis is carried out in a tablet format and takes about 2 hours. The signal elements here are the color variants of the photoprotein obelin: violet, with the replacement W92F,H22E,D12C emitting a fast signal ( $k_d = 0.6 \text{ s}^{-1}$ ) shifted to the short-wave region ( $\lambda_{\text{max}} = 387 \text{ nm}$ ) and a green one with the replacement Y138F,A6C with a slow signal ( $k_d = 6.1 \text{ s}^{-1}$ ), shifted to the long-wave region ( $\lambda_{\text{max}} = 493 \text{ nm}$ ).

The conjugates: a violet obelin with oligothymidylate (W92F,H22E,D12C – dT30) and a green obelin with antibodies to fluorescein (Y138F,A6C – anti FAM) were obtained using site-specific conjugation.

The resulting conjugates were used to identify a number of polymorphisms associated with the risk of development of various pathologies, both in a single gene and the genes localized on different chromosomes [1-3].

In collaboration with Krasnoyarsk regional clinical cancer center named after A.I. Kryzhanovsky the prevalence of mutations R151C, R160W, and D294H in melanocortin 1 receptor gene associated with the risk of melanoma in Krasnoyarsk Region population was investigated. DNA samples of 174 patients with a histologically confirmed diagnosis of skin melanoma and 200 DNA samples of healthy donors were studied. All the results of bioluminescent analysis were confirmed by direct sequencing.

The proposed method was used for simultaneous determination of SNPs in CAT, NCL, HSPA1L, and PCDH15 genes, presumably associated with the threat of neurosensory hearing loss in 288 workers of the Krasnash machine-building plant. A research on the relationship between the risk of hearing impairment and these polymorphisms was carried out jointly with the staff of the Federal Siberian research clinical centre of FMBA of Russia.

All matrices were obtained simultaneously, using the multiplex PCR. To monitor the correctness of the analysis, a positive control sample of the plasmid DNA containing polymorphic regions of all the investigated genes was constructed and obtained.

The method we developed to detect the gene allelic variants allows fast and highly reliable determination of personal genetic characteristics of patients.

### References:

1. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Bondar A.A., Kozlova A.V., Ruksha T.G., Frank L.A. Bioluminescent assay to detect melanocortin-1 receptor (MC1R) polymorphisms (R160W, R151C, and D294H) // *Mol Biol (Mosk)*. – 2015. – T.49, No. 6 – C.953-958.
2. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Frank L.A. Simultaneous genotyping of four single nucleotide polymorphisms associated with risk factors of hemostasis disorders // *Journal of Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. – 2015. – V. 18, No. 10, P. 930-937.
3. Krasitskaya, V.V., Kudryavtsev A. N., Shimomura O., Frank L.A. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay // *Anal. Methods*. – 2013. – No. 5. – P. 636-640.

УДК 577.113.(7+4):547.327

## ПЕПТИДНЫЕ КОНЪЮГАТЫ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (П-ФГО): СИНТЕЗ, ОЧИСТКА И ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ АНТИСМЫСЛОВЫХ АГЕНТОВ

Фокина А.А.<sup>1</sup>, МакКлори Г.<sup>2</sup>, Челобанов Б.П.<sup>1,3</sup>, Буракова Е.А.<sup>1</sup>, Ильина А.М.<sup>3</sup>, Клабенкова К.В.<sup>3</sup>, Ван М.<sup>3</sup>, Арзуманов А.А.<sup>4</sup>, Гейт М.Дж.<sup>4</sup>, Фудзии М.<sup>5</sup>, Вуд М.Дж.А.<sup>2</sup>, Стеценко Д.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Отделение физиологии, анатомии и генетики, Оксфордский университет, Оксфорд, Великобритания

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Лаборатория молекулярной биологии, Кембридж, Великобритания

<sup>5</sup> Университет Киндай, Фукуока, Япония

630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8  
 alesya\_fokina@mail.ru

Рассмотрен синтез конъюгатов незаряженных аналогов РНК фосфорилгуанидиновых олиго-2'-О-метилрибонуклеотидов с векторными пептидами (П-ФГО) и их активность как антисмысловых агентов. Предложен новый метод анализа гомогенности и полупрепаративного выделения П-ФГО с помощью электрофореза в денатурирующем ПААГ в кислых условиях.

**Ключевые слова:** антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды, аналоги РНК, клеточная доставка, мышечная дистрофия Дюшена.

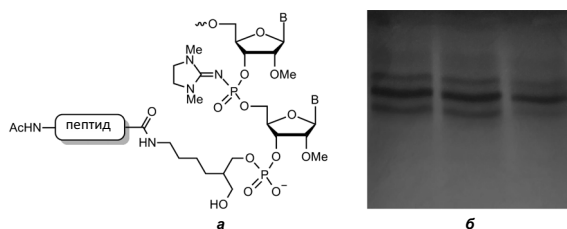


Рис. 1. а) Структура пептидного конъюгата фосфорилгуанидинового олигонуклеотида (П-ФГО). б) Выделение П-ФГО гель-электрофорезом в денатурирующем ПААГ в кислых условиях.

Конъюгаты с векторными пептидами рассматриваются как перспективные средства для улучшения транспорта олигонуклеотидов в клетки. К настоящему времени наиболее изучены свойства пептидных конъюгатов незаряженных аналогов нуклеиновых кислот: таких, например, как фосфордиамидные морфолиновые олигонуклеотиды (ФМО). В частности, пептидные конъюгаты морфолиновых олигонуклеотидов (П-ФМО) исследуются в настоящее время как потенциальные антисмысловые агенты для лечения тяжелого заболевания мышечной дистрофии Дюшена (МДД) с улучшенной доставкой в скелетную мышечную ткань, диафрагму и в сердце [1].

Недавно нами были разработаны новые аналоги нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) [2, 3]. Было показано, что пептидные конъюгаты фосфорилгуанидиновых олиго-2'-О-метилрибонуклеотидов (П-ФГО) (рис. 1, а) проявляют антисмысловую активность, сопоставимую с соответствующим П-ФМО в культуре клеток и в *in vivo* модели МДД [4]. Для анализа гомогенности и выделения П-ФГО нами был разработан метод очистки при помощи денатурирующего электрофореза в ПААГ в кислых условиях. Данный метод позволяет эффективно отделять конъюгаты от исходных ФГО и пептида (рис. 1, б). Структура П-ФГО, выделенных электрофорезом, была подтверждена данными масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Таким образом, конъюгаты фосфорилгуанидиновых олиго-2'-О-метилрибонуклеотидов (П-ФГО) могут рассматриваться как перспективные антисмысловые терапевтические агенты.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты № 15-29-01334 и 16-03-01055) и Базового проекта ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (VI.62.1.3, 0309-2016-0005) «Терапевтические нуклеиновые кислоты». Синтез модифицированных олигонуклеотидов проводился за счет гранта РФФИ № 17-44-07003. Синтез пептидов проводился при поддержке гранта РФФИ № 14-44-00068.

## Литература:

1. Lehto T., Castillo Alvaraz A., Gait M.J., Coursindel T., Wood M.J.A., Lebleu B., Boisguerin P. Cellular trafficking determines the exon skipping activity of Pip6a-PMO in mdx skeletal and cardiac muscle cells. // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – No. . – P. 3207-3217.
2. Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. Фосфорилгуанидины. Новый класс аналогов нуклеиновых кислот // *Acta Naturae.* – 2014. – Т. 6. – № . – С. 123-125.
3. Stetsenko D.A., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Modified oligonucleotides and methods for their synthesis. // *International patent application WO2016/028187A1, August 22, 2014.*
4. Стеценко Д.А., Wood M.J.A., McClorey G., Фокина А.А., Челобанов Б.П., Купрюшкин М.С., Пышный Д.В., Арзманов А.А., Gait M.J. Аналоги олигонуклеотидов как средства коррекции сплайсинга для лечения мышечной дистрофии Дюшенена. // Заявка на международный патент PCT/RU2017/050092, 26.09.2016.

UDC 577.113.(7+4):547.327

## PEPTIDE CONJUGATES OF PHOSPHORYL GUANIDINE OLIGONUCLEOTIDES (P-PGO): SYNTHESIS, PURIFICATION AND APPLICATION AS ANTISENSE AGENTS

Fokina A.A.<sup>1</sup>, McClorey G.<sup>2</sup>, Chelobanov B.P.<sup>1,3</sup>, Burakova E.A.<sup>1</sup>, Ilyina A.M.<sup>3</sup>, Klabenkova K.V.<sup>3</sup>, Wang M.<sup>3</sup>, Arzumanov A.A.<sup>4</sup>, Gait M.J.<sup>4</sup>, Fujii M.<sup>5</sup>, Wood M.J.A.<sup>2</sup>, Stetsenko D.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> University of Oxford, Oxford, UK

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

<sup>5</sup> Kindai Univerity, Fukuoka, Japan

630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8

alesya\_fokina@mail.ru

Synthesis of peptide conjugates of charge-neutral RNA analogues phosphoryl guanidine oligo-2'-O-methylribonucleotides (P-PGO) and their biological activity as antisense agents are described. A new method for analysis and semi-preparative purification of P-PGO by denaturing PAGE under acidic conditions is proposed.

**Key words:** antisense oligonucleotides, RNA analogues, cellular delivery, Duchenne muscular dystrophy

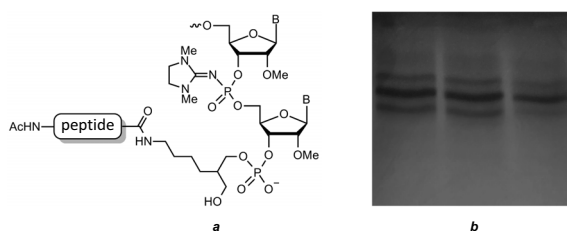


Fig. 1. a) The structure of peptide conjugates of phosphoryl guanidine oligo-2'-O-methylribonucleotides (P-PGO). b) Separation of P-PGO by denaturing PAGE under acidic conditions.

Conjugates of cell penetrating peptides are considered as promising vehicles to achieve oligonucleotide delivery into cells. To date, the most studied peptide conjugates are those of charge-neutral nucleic acid analogues such as, e.g., phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides (PMO). In particular, peptide conjugates of morpholino oligonucleotides (P-PMO) are currently investigated as potential antisense agents for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DMD) with improved uptake into the skeletal muscles, diaphragm and heart [1].

Recently, we have designed a novel type of nucleic acid analogues, namely, phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO) [2, 3]. It has been shown that peptide conjugates of phosphoryl guanidine oligo-2'-O-methylribonucleotides (P-PGO) (Fig. 1, a) exhibit antisense activity comparable to the corresponding P-PMO in cell culture and in a mouse model of DMD [4].

We have developed a new method for the assessment of homogeneity and efficient separation of P-PGO using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under denaturing conditions at acidic pH. The method allows one to efficiently separate the conjugate from the starting PGO and peptide (Fig. 1, b). The structure of P-PGO isolated by



PAGE was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry.

To conclude, conjugates of phosphoryl guanidine oligo-2'-O-methylribonucleotides (P-PGO) with cell penetrating peptides can be considered as a promising antisense therapeutic agents.

This work has been partially supported by RFBR grants Nos. 15-29-01334 and 16-03-01055, and the Russian Government funded budget project VI.62.1.3, 0309-2016-0005 (2017–2020) "Therapeutic nucleic acids". Oligonucleotide syntheses were supported by RSF grant No. 17-44-07003. Peptide syntheses were supported by RSF grant No. 14-44-00068.

#### References:

1. Lehto T., Castillo Alvaraz A., Gait M.J., Coursindel T., Wood M.J.A., Lebleu B., Boisguerin P. Cellular trafficking determines the exon skipping activity of Pip6a-PMO in mdx skeletal and cardiac muscle cells. // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – No. . – P. 3207-3217.
2. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. Phosphoryl Guanidines: A New Type of Nucleic Acid Analogues. // *Acta Naturae.* – 2014. – V. 6. – No. 4. – P. 116-118.
3. Stetsenko D.A., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V. Modified oligonucleotides and methods for their synthesis. // *International patent application WO2016/028187A1, August 22, 2014.*
4. Stetsenko D.A., Wood M.J.A., McClorey G., Fokina A.A., Chelobanov B.P., Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Arzumanov A.A., Gait M.J. Oligonucleotide analogues as splice-correcting agents for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. // *International PCT application PCT/RU2017/050092, September 26, 2016.*

УДК 577.151.35

## ПРИМЕНЕНИЕ ЭМУЛЬСИОННОЙ ПЦР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫРОЖДЕННЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК С ВВЕДЕНИЕМ МОДИФИКАЦИЙ В ИЗОЛИРОВАННЫХ МИКРООБЪЕМАХ

Лапа С.А.<sup>1</sup>, Ромашова К.С.<sup>1</sup>, Спицын М.А.<sup>1,2</sup>, Гусейнов Т.О.<sup>1</sup>, Чудинов А.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия  
 119991, Москва, ул. Вавилова, д.32

<sup>2</sup> ООО «ИБМХ-ЭкоБиоФарм», Москва, Россия  
 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8  
 e-mail: lapa@biochip.ru

Применен и оптимизирован метод эмульсионной ПЦР для получения вырожденных ДНК-библиотек с одновременным введением модификаций. Получены шесть вариантов одноцепочечных модифицированных ДНК-библиотек.

**Ключевые слова:** модифицированные дезоксинуклеозидтрифосфаты, модифицированные ДНК, комбинаторные ДНК-библиотеки, эмульсионная ПЦР, нуклеиновые аналоги антител, аптамеры, SELEX

Аптамеры представляют собой одноцепочечные ДНК- либо РНК-олигонуклеотиды и являются функциональными аналогами моноклональных антител. Выбор аптамера осуществляется в процессе пошагового обогащения иницирующей библиотеки лигандами, имеющими аффинное сродство к индивидуальной молекулярной мишени (SELEX).

Получение комбинаторной библиотеки как иницирующей компоненты процесса эволюционного обогащения является краеугольным камнем методологии SELEX. Введение модификаций в комбинаторные библиотеки в ряде случаев повышает вероятность отбора высокоспецифичного аптамера [1]. Требования к сохранению представительности библиотек при амплификации возрастают в случае применения модификаций, вводимых в процессе ПЦР с применением модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов. Конкуренция амплификации, связанная с вырожденным характером библиотеки, способна приводить к преимущественному накоплению нуклеотидных последовательностей, «удобных» для амплификации, и потере в результирующем пуле олигонуклеотидов потенциально специфичных к мишени последовательностей.

В настоящей работе применен и адаптирован метод эмульсионной ПЦР [2] для амплификации комбинаторных библиотек с одновременным введением модификаций в последовательность ДНК. В качестве субстратов использованы модифицированные dUTP, описание синтеза и свойств которых приведено в [3]. Структурные формулы соединений приведены на Рис. 1а. Для получения стабильной в условиях ПЦР

эмульсии применена комбинация из трех ПАВ (Рис. 1б), оптимизирован количественный состав и соотношение водной и органической фаз.

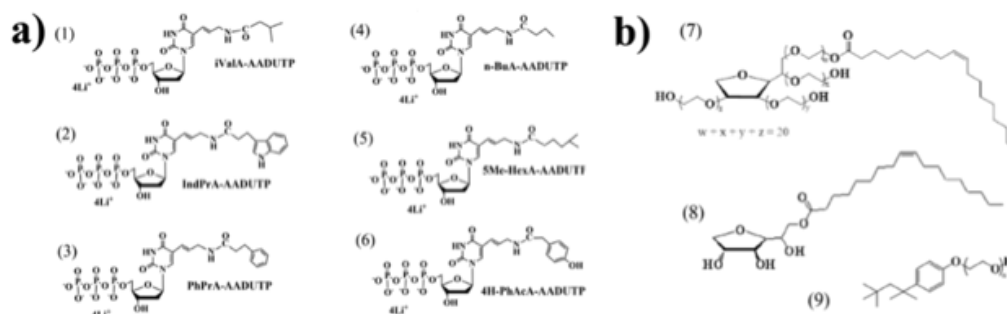


Рис. 1. а) Модифицированные dUTP; б) ПАВ для создания обратной эмульсии.

Проведено разделение цепей ПЦР-продуктов ферментативным методом (с помощью экзонуклеазы фага лямбда) и на магнитных частицах с иммобилизованным стрептавидином. Получено шесть вариантов одноцепочечных комбинаторных библиотек, содержащих модификации (Рис. 1а), для применения в качестве универсальных иницирующих наборов для проведения SELEX к широкому спектру молекулярных мишеней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение №14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

#### Литература:

1. Gold L., Ayers D., Bertino J., et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. // *PLoS One*. – 2010. – №5. – e15004.
2. Shao K., Ding W., Wang F., et al. Emulsion PCR: A High Efficient Way of PCR Amplification of Random DNA Libraries in Aptamer Selection // *PLoS ONE*. – 2011. № 6. – e24910.
3. Chudinov A.V., Kiseleva Y.Y., Kuznetsova V.E., et al. Enzymatic synthesis of high-modified DNA // *Mol Biol (Mosk)*. – 2017. – №51. – С. 534-544.

UDC 577.151.35

## APPLICATION OF THE EMULSION PCR METHOD TO OBTAIN COMBINATORIAL DNA LIBRARIES USING INCORPORATION OF MODIFICATIONS IN ISOLATED MICROVOLUMES

Lapa S.A.<sup>1</sup>, Romashova K.S.<sup>1</sup>, Spitsyn M.A.<sup>1,2</sup>, Guseinov T.O.<sup>1</sup>, Chudinov A.V.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
32, Vavilova st., Moscow, 119991, Russia

<sup>2</sup> IBMC-EcoBioPharm Ltd., Moscow, Russia  
10/8, Pogodinskaya st., Moscow, 119121, Russia  
e-mail: lapa@biochip.ru

The method of emulsion PCR was applied and optimized to obtain combinatorial DNA libraries with simultaneous incorporation of modifications. Six variants of single-stranded modified DNA libraries were obtained.

**Key words:** modified deoxynucleoside triphosphates, modified DNA, combinatorial DNA libraries, emulsion PCR, nucleic analogues of antibodies, aptamers, SELEX

Aptamers are single-stranded DNA or RNA oligonucleotides and are functional analogues of monoclonal antibodies. Aptamer selection is carried out in the process of step-by-step enrichment of the initiating library with ligands that show affinity to the individual molecular target (SELEX).

Combinatorial library is the initiating component of the evolutionary enrichment process in SELEX methodology. The appropriate constructing and preparation of the library is the cornerstone in the aptamer selection process. The incorporation of modifications to combinatorial libraries in some cases increases the probability of a highly specific aptamer selection [1]. Application of modifications introduced during PCR with modified deoxynucleoside

triphosphates escalates the requirements to keep the initial representativeness of the library. Competitive amplification (associated with the combinatorial nature of the library) can lead to the predominant accumulation of nucleotide sequences, "convenient" for amplification, and to the loss of potentially target-specific sequences in the resulting oligonucleotide pool.

Here we report the application and adaptation of the emulsion PCR method [2] to amplify combinatorial libraries with simultaneous incorporation of modifications into the DNA sequence. Modified dUTPs were used as substrates, the description of synthesis and properties of which are given in [3]. The structural formulas of the compounds are shown in Fig. 1a. The combination of three surfactants (Fig. 1b) has been used to obtain an emulsion that is stable in PCR conditions. The quantitative composition, proportions and ratio of water and organic phases were optimized.

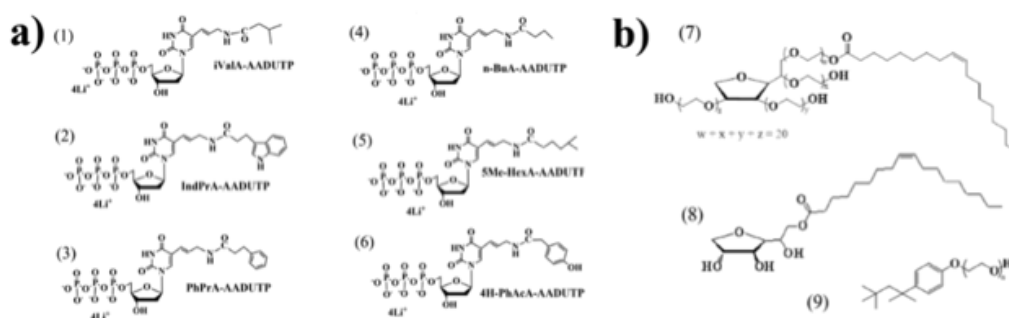


Fig. 1. a) Modified dUTPs; b) surfactant composition to create a reverse emulsion.

The DNA strands of PCR products were separated by enzymatic method (using lambda exonuclease) and with streptavidin magnetic particles. Six variants of single-stranded modified combinatorial libraries are obtained with modified nucleotides (Fig. 1a). The libraries are convenient for use as an universal initiating KIT for carrying out SELEX to a wide range of molecular targets.

The work was funded by Ministry of education and science of the Russian Federation (agreement No. 14.576.21.0096, the unique identifier of the project RFMEFI57617X0096).

#### References:

1. Gold L., Ayers D., Bertino J., et al. Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. // *PLoS One*. – 2010. - №5. - e15004.
2. Shao K., Ding W., Wang F., et al. Emulsion PCR: A High Efficient Way of PCR Amplification of Random DNA Libraries in Aptamer Selection // *PLoS ONE*. – 2011. № 6. - e24910.
3. Chudinov A.V., Kiseleva Y.Y., Kuznetsova V.E., et al. Enzymatic synthesis of high-modified DNA // *Mol Biol (Mosk)*. – 2017. – №51. – С. 534-544.

УДК 621.039.7

## РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ АНТИБИОТИКА ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Гендриксон О.Д. <sup>1</sup>, Шанин, И.А. <sup>2</sup>, Жердев А.В. <sup>1</sup>, Дзантиев Б.Б. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33

E-mail: odhendrick@gmail.com

<sup>2</sup> Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1

Разработана методика иммунохроматографического анализа (ИХА) антибиотика ципрофлоксацина в двух форматах: с использованием конъюгатов наноразмерных маркеров со специфическими или антивидовыми антителами. Пределы обнаружения составили 50 и 10 пг/мл, соответственно.

**Ключевые слова:** ципрофлоксацин, антибиотики, иммунохроматография, контроль продуктов питания

При производстве продуктов питания важной задачей является контроль содержания остаточных

количеств антибиотиков – приоритетных контаминант, представляющих серьезную угрозу для здоровья человека. Для решения этой проблемы активно используется иммунохроматографический анализ, обладающий высокой специфичностью и чувствительностью и предоставляющий возможность быстрого вне-лабораторного скрининга большого количества образцов продукции.

В данном исследовании для высокочувствительной детекции антибиотика группы фторхинолонов ципрофлоксацина, широко используемого в ветеринарной практике и контаминирующего сельскохозяйственную продукцию, предложены форматы ИХА, основанные на различных способах введения наноразмерных маркеров (коллоидного золота). Прямое введение метки осуществлялось при конъюгации коллоидного золота с антителами, специфическими к ципрофлоксацину. Непрямое введение маркера подразумевало иммобилизацию на поверхности наночастиц антивидовых иммуноглобулинов. Показано, что данные подходы позволяют детектировать ципрофлоксацин с пределами обнаружения 50 и 10 пг/мл в течение 15 мин. Чувствительность разработанных форматов ИХА сопоставима с характеристиками традиционного гетерогенного иммуноферментного определения, однако иммунохроматографический подход позволяет сократить время анализа в 4 раза.

Разработанные системы детекции были апробированы для детекции антибиотика в пробах молока. Показано, что иммунохроматографический анализ позволяет определять ципрофлоксацин в молоке без сложной процедуры предварительной пробоподготовки с сохранением высоких аналитических характеристик. Благодаря доступности и универсальности предложенные подходы перспективны для контроля антибиотиков, а также широкого ряда других низкомолекулярных контаминант.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-58-4518-Инд\_а).

UDC 621.039.7

## DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS FOR DETECTION OF ANTIBIOTIC CIPROFLOXACIN IN FOODSTUFFS

Hendrickson O.D.1, Shanin I.A.2, Zherdev A.V.1, Dzantiev B.B.1

Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
119071, Moscow, Leninsky prospect, 33

E-mail: odhendrick@gmail.com

2M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
119991, Moscow, Leninskiye gory, 1

In this study, two formats of immunochromatographic analysis (ICA) of antibiotic ciprofloxacin using conjugates of nanomarkers with specific or anti-species antibodies were developed. The detection limits were 50 and 10 pg/mL, respectively.

Keywords: ciprofloxacin, antibiotics, immunochromatography, food control

A control of residual quantities of antibiotics that are priority contaminants posing serious risks to human health is an important task in food production. To solve this problem, the immunochromatographic analysis is actively used, which has high specificity and sensitivity and provides the possibility of rapid non-laboratory screening of a large number of product samples.

In this study, for the highly sensitive detection of antibiotic ciprofloxacin ICA formats based on various approaches of nanomarker (colloidal gold nanoparticles) introducing are proposed. Ciprofloxacin belongs to fluoroquinolone group of antibiotics and widely used in veterinary practice often contaminating agricultural products. Direct labeling was carried out by conjugation of colloidal gold with ciprofloxacin-specific antibodies. The indirect introduction of the marker implied the immobilization of anti-species immunoglobulins on the surface of nanoparticles. It was demonstrated that these approaches allow determination of ciprofloxacin within 15 min with detection limits of 50 and 10 pg/mL respectively. The sensitivity of the developed ICA formats is comparable to the characteristics of the traditional microplate enzyme-linked immunosorbent assay, but immunochromatographic approach allows 4-fold reducing of the assay duration.

The developed ICA systems were tested for antibiotic detection in milk samples. It was shown that immunochromatographic analysis allows determination of ciprofloxacin in milk without a procedure of complex preliminary sample preparation with preservation of high analytical characteristics. Due to availability and universality, the proposed methods are promising for the control of antibiotics, as well as a wide range of other low molecular weight contaminants.

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project 17-58-4518-Инд\_а).

УДК 577.29

## СОЗДАНИЕ НА ТВЕРДОЙ ФАЗЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СЛОЕВ, РЕАЛИЗУЮЩИХ БАЗОВЫЕ ЛОГИЧЕСКИЕ ОПЕРАЦИИ, И ИХ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ СПЕКТРАЛЬНО-ФАЗОВОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ

 Пушкарев А.В.<sup>1,2</sup>, Орлов А.В.<sup>1</sup>, Мочалова Е.Н.<sup>1,2</sup>, Никитин М.П.<sup>2</sup>, Никитин П.И.<sup>1</sup>
<sup>1</sup> Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия  
 141701, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер. 9

E-mail: pushkarev@phystech.edu

На плоской стеклянной поверхности созданы молекулярные слои, способные в результате логического анализа микроокружения блокировать или разрешать присоединение биомолекул. Разработан удобный метод оптимизации параметров слоев, оценены кинетические параметры реакций. Продемонстрировано сохранение функционала слоев при прямом переносе на поверхность наночастиц.

**Ключевые слова:** биокомпьютинг, безметочные методы анализа, умные материалы, спектрально-фазовая интерферометрия

Одним из перспективных направлений биомедицины является использование биокомпьютерных супрамолекулярных агентов, способных самостоятельно выполнять логический анализ микроокружения и принимать решение, например, о высвобождении лекарственного средства в очаг заболевания.

Ранее авторами были предложены биокомпьютерные структуры на основе наночастиц, функционал которых определялся конструкцией молекулярного слоя на их поверхности [1]. Изучение и оптимизация таких слоев в гомогенном формате – сравнительно сложная задача. В настоящей работе разработан метод быстрого конструирования биокомпьютерных слоев на твердой фазе и их исследования с помощью безметочного метода спектрально-фазовой интерферометрии (СФИ) [2]. Показано, что прямой перенос полученных умных слоев на поверхность наночастиц позволяет получить агенты, обладающие полным биокомпьютерным функционалом исходных слоев.

На стеклянной поверхности сенсорного СФИ-чипа созданы молекулярные слои, реализующие базовые логические операции «ДА» и «НЕ», на основе которых могут быть созданы более сложные логические конструкции. Логической «единицей» на входе считалось наличие лиганда входного рецептора (модельной анализируемой малой молекулы) в пробе, а единицей на выходе – связывание лиганда выходного рецептора (биомолекулы – мишени) с поверхностью. В слое, реализующем функцию «ДА», входной и выходной рецепторы ко-локализованы на твердой фазе. В процессе сборки слоя с входными рецепторами посредством лиганд-рецепторных взаимодействий связывались структуры, стерически блокирующие молекулы выходного рецептора от взаимодействия с их лигандом [1]. При наличии лиганда входного рецептора связь блокирующих структур с входными рецепторами разрушалась, что позволяло ему связаться с поверхностью. В слое, реализующем функцию «НЕ», на твердой фазе были иммобилизованы входные рецепторы, с которыми в процессе сборки связывались молекулы конъюгата выходного рецептора и лиганда входного рецептора. В присутствии лиганда входного рецептора связь конъюгата с поверхностью разрушалась, что не позволяло лиганду выходного рецептора связаться с поверхностью.

Метод СФИ позволил в реальном времени, без влияния каких-либо меток на реакции, наблюдать каждую стадию формирования слоев на поверхности. С помощью этого метода было определено оптимальное соотношение компонентов слоев, а также их чувствительность к лиганду входного рецептора. Так, например, для слоя «ДА» концентрация этого лиганда, переключаящая слой в состояние «присоединения выходного лиганда» составила 0,47 нг/мл. Были рассчитаны кинетические параметры сборки слоев и процессов обработки входного и формирования выходного сигналов. Полученные результаты указывают на высокую стабильность «умных» слоев, высокие скорости обработки входного сигнала (несколько секунд) и формирования выходного (десятки секунд). Особенно важно, что созданные биокомпьютерные слои полностью сохраняют свою работоспособность при прямом переносе на поверхность наночастиц. Полученные слои перспективны для использования в биосенсорике и для разработки тераностических агентов.

Литература:

1. Nikitin M.P. et al. Biocomputing based on particle disassembly // *Nat. Nanotechnol.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 9, № August. P. 716–722.
2. Nikitin P.I. et al. Spectral-phase interference method for detecting biochemical reactions on a surface // *Quantum Electron.* 2000. Vol. 30, № 12. P. 1099–1104.

UDC 577.29

## DEVELOPMENT OF MOLECULAR LOGIC-GATING BIOLAYERS ON SOLID PHASE AND THEIR INVESTIGATION BY SPECTRAL-PHASE INTERFEROMETRY

Pushkarev A.V.<sup>1,2</sup>, Orlov A.V.<sup>1</sup>, Mochalova E.N.<sup>1,2</sup>, Nikitin M.P.<sup>2</sup>, Nikitin P.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

9 Institutskii per., Dolgoprudny, Moscow Region 141701, Russia

E-mail: pushkarev@phystech.edu

Molecular layers capable of blocking or allowing the attachment of biomolecules as a result of logic analysis of microenvironment are created on a flat glass surface. A convenient method for optimization of the layers' parameters is developed, the kinetic parameters of the reactions are estimated. Direct translation of the developed layers onto nanoparticle surface has shown no loss in their functionality.

**Key words:** biocomputing, label-free biosensing, smart materials and interfaces, spectral-phase interferometry

One of the most promising research areas of biomedicine is using supramolecular biocomputing structures that can autonomously analyze their microenvironment and make a decision, for example, to release a therapeutic preparation to the disease site.

Earlier, the authors proposed a nanoparticle-based biocomputing structures, whose functionality was due to the design of a molecular layer on their surface [1]. Investigation and optimization of such layers in homogeneous format is a relatively complicated task. Here, we propose a method for rapid design of the biocomputing layers on solid phase and their investigation by the spectral-phase interferometry [2]. The direct translation of the proposed layers onto nanoparticle surface yields nanoagents of full biocomputing functionality of the initial layer.

The molecular layers implementing basic logic gates "YES", "NOT" have been created on the surface of glass sensor chip. Based on these gates, more complex logic constructions can be created. The presence of input receptor's ligand (e.g., detectable model small molecules) in sample is considered as logic "true" input. Binding of the output receptor's ligand (e.g., target biomolecule) to the surface represents logic "true" output signal. In the YES-gate layer, the input and output receptor's ligands are collocated on solid phase. During assembly of the YES-gate layer, the output receptor is sterically shielded from interaction with its ligand by 'shielding' structures bound on the surface via an input receptor-ligand bond [1]. In the presence of input ligand, this bond is destroyed, and the layer disassembles, making the output receptor accessible to the output receptor's ligand. In the NOT-gate layer, only the input receptor is immobilized on the solid phase. During assembly of this layer, the input receptor's ligand conjugated with the output receptor binds with the input receptor via the input receptor-ligand bond. When the input ligand present, the NOT-layer disassembles, preventing the output receptor's ligand from binding with the glass surface.

The SPI technique permits avoiding the influence of labels on reactions, as well as monitoring every stage of the logic-gating on the surface. Using this method, the optimal composition of the layers and their sensitivity to the input receptor's ligand were determined. For instance, the threshold concentration of the input that switched the YES-gate layer to the state that permitted binding with the output receptor's ligand was 0,47 ng/ml. The kinetic parameters of assembly of the layers, of input sensing and processing of output were also calculated. The obtained data indicate high stability of the "smart" layers, rapid processing of input (few seconds) and output signal (tens of seconds). More importantly, no degradation in functionality was observed after direct translation of the developed biocomputing layers onto nanoparticle surface. The proposed layers are also promising for use in biosensing and for the development of theranostic agents.

### References:

1. Nikitin M.P. et al. Biocomputing based on particle disassembly // *Nat. Nanotechnol.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 9, № August. P. 716–722.
2. Nikitin P.I. et al. Spectral-phase interference method for detecting biochemical reactions on a surface // *Quantum Electron.* 2000. Vol. 30, № 12. P. 1099–1104.

УДК 576.5

## СТРАТЕГИИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА И ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ

 Кудрявцев И.В. <sup>1</sup>, Haley R. Pugsley <sup>2</sup>, Sherree L. Friend <sup>2</sup>
*1 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12  
 igorek1981@yandex.ru*
*2 MilliporeSigma, 645 Elliott Avenue West, Suite 100, Seattle, WA 98119, USA*

Проточная цитометрия с визуализацией сочетает возможности статистического анализа больших клеточных популяций методом проточной цитометрии, с информационным контентом, основанным на морфологическом анализе клеток с помощью микроскопии.

**Ключевые слова:** проточная цитометрия с визуализацией, экзосомы, внеклеточные везикулы

Внеклеточные везикулы представляют собой природные наночастицы, секретируемые различными клетками и способные переносить маркеры белка и генетическую информацию, тем самым участвуя в межклеточной коммуникации. Есть серьезные основания полагать, что количественные и качественные характеристики микрочастиц, продуцируемых клетками различных тканей при нормальном и патологическом путях, могут обеспечить значительную диагностическую и прогностическую информацию и служить биомаркером для различных заболеваний, в том числе онкологических заболеваний.

Лишь в последнее время была отмечена важность внеклеточных везикул в качестве ключевых посредников межклеточной коммуникации. Внеклеточные везикулы представляют собой структуры, продуцируемые на мембранной основе, которые представляют собой экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Было показано, что экзосомы переносят молекулы между клетками и имеют потенциал для передачи сигналов между клетками. Экзосомы выделяются в нормальных физиологических условиях; однако, считается, что экзосомы служат медиаторами в патогенезе неврологических, сосудистых, гематологических и аутоиммунных заболеваний, а также рака. Количественная оценка и характеристика экзосом в воспроизводимом и надежном виде была затруднена из-за их небольшого размера (диаметр 50-100 нм). Стратегия анализа экзосом может быть осуществлена с помощью микроскопии высокого разрешения, однако этот метод имеет очень низкую пропускную способность. Попытки проанализировать экзосомы с использованием традиционных проточных цитометров были ограничены пределом обнаружения таких мелких частиц и низким показателем преломления. Чтобы преодолеть эти ограничения, используется метод мультиспектральной цитометрии изображений клеток в потоке, который имеет преимущество сочетания высокопроизводительной проточной цитометрии с более высокой чувствительностью к наночастицам и дополнительным преимуществом визуализации, которое может обеспечить визуальное подтверждение целостности и характеристики частиц.

Показаны преимущества метода мультиспектральной цитометрии для исследования взаимодействия экзосом с лейкоцитами. Экзосомы, полученные из клеток Jurkat, исследованы для их предпочтительных взаимодействий с субпопуляциями клеток крови путем объединения иммунофенотипирования с морфологическими параметрами для измерения их связывания и интернализации.

Экзосомы, полученные из клеток Jurkat, были мечены CD63-AF647 и добавлены к лейкоцитам крови человека. Клетки были мечены для иммунофенотипирования, фиксированы и затем помечены CD63-PE для идентификации внешних экзосом. По построению интернализации по индексу подобия ярких деталей, можно идентифицировать 3 популяции: внутренние экзосомы, внешние/внутренние экзосомы и колокализованные внешние экзосомы. Нейтрофилы, моноциты и лимфоциты идентифицировали иммунофенотипированием; процент каждой субпопуляции клеток крови был ассоциирован с экзосомами CD63, меченными AF647. Моноциты имели самый высокий процент клеток, связанных с CD63-AF647 экзосомами - 67%. Во всех типах клеток большинство клеток, ассоциированных с мечеными экзосомами CD63-AF647, были либо полностью, либо частично интернализированными (совокупность внешних/внутренних экзосом).

Платформа проточной цитометрии ImageStreamX MkII сочетает возможности статистического анализа больших клеточных популяций методом проточной цитометрии, с информационным контентом, основанным на морфологическом анализе клеток с помощью микроскопии. Это метод позволяет оценить, были ли интерферированы экзосомы различными субпопуляциями клеток крови объективным, количественным и статистически значимым образом.

УДК 576.5

## STRATEGIES OF QUANTITATIVE ANALYSIS AND CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES FOR RESEARCHES IN THE FIELD OF ONCOLOGY BY IMAGING FLOW CYTOMETRY

Kudryavtsev Igor <sup>1</sup>, Haley R. Pugsley <sup>2</sup>, Sherree L. Friend <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine.

12, Academician Pavlov Street, St.-Petersburg, Russia, 197376

igorek1981@yandex.ru

<sup>2</sup> MilliporeSigma, 645 Elliott Avenue West, Suite 100, Seattle, WA 98119, USA

Annotation: Imaging flow cytometry platform has the quantitative power of large sample sizes common to flow cytometry with the information content of microscopy.

**Key words:** Imaging Flow Cytometry, Extracellular vesicles, exosomes

Exosomes are natural nanoparticles secreted by different cells and capable of carrying protein markers and genetic information, thus participating in intercellular communication. There are serious reasons to believe that the quantitative and qualitative characteristics of microparticles produced by cells of various tissues in normal and pathological ways can provide significant diagnostic and prognostic information and serve as a biomarker for various diseases, including oncological diseases.

Only recently has the importance of extracellular vesicles as key mediators of intercellular communication been appreciated. Extracellular vesicles are membrane derived structures that include exosomes, microvesicles and apoptotic bodies. Exosomes have been shown to transfer molecules between cells and have the potential to transfer signals between cells. Exosomes are released under normal physiological conditions; however, exosomes are also believed to serve as mediators in the pathogenesis of neurological, vascular, hematological and autoimmune diseases as well as cancer. Quantifying and characterizing exosomes in a reproducible and reliable manner has been difficult due to their small size (50 – 100 nm in diameter). Exosomes analysis can be done using high-magnification microscopy; however, this technique has a very low throughput. Attempts to analyze exosomes using traditional flow cytometers has been hampered by the limit of detection of such small particles and low refractive index. To overcome these limitations we have employed multispectral imaging flow cytometry that has the advantage of combining high throughput flow cytometry with higher sensitivity to small particles and the added benefit of imaging that can provide visual confirmation of particle integrity and characterization. In this study we use multispectral imaging flow cytometry to investigate the interaction of exosomes with white blood cells. Exosomes derived from Jurkat cells will be investigated for their preferential interactions with blood cell subsets by combining immunophenotyping with morphological parameters to measure their binding and internalization.

Exosomes derived from Jurkat cells were labeled with anti-human CD63-AF647 and added to human white blood cells. The cells labeled for immunophenotyping, fixed, and then labeled with anti-human CD63-PE to identify external exosomes. By plotting Internalization vs Bright Detail Similarity we were able to identify 3 populations: Internal Exosomes, External/Internal Exosomes, and Co-localized External Exosomes. Neutrophils, monocytes, and lymphocytes were identified by immunophenotyping; we investigated what % of each blood cell subset was associated with the CD63-AF647 labeled exosomes and whether the exosomes were internalized or external. The monocytes had the highest % of cell associated with CD63-AF647 labeled exosomes at 67%. And in all of the cell types the majority of the cells associated with CD63-AF647 labeled exosomes were either internalized or partially internalized (External/Internal Exosomes population).

The ImageStreamX MkII imaging flow cytometry platform has the quantitative power of large sample sizes common to flow cytometry with the information content of microscopy. This study showed a method to determine if exosomes have been internalized by the different blood cell subsets in an objective, quantitative, and statistically robust manner.



УДК 577.1.04;577.15.03.

## ТЕСТИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ: РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ МЕЛАФЕНА И ПРОИЗВОДНЫХ АНТИОКСИДАНТА ФЕНОЗАНА, НА МОДЕЛЯХ БИОМЕМБРАН - МУЛЬТИЛАМЕЛЛЯРНЫХ ЛИПОСОМАХ

Алексеева О.М. <sup>1</sup>, Ким Ю.А. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия, 119334 г. Москва, ул. Косыгина, д. 4, e-mail: [olgavek@yandex.ru](mailto:olgavek@yandex.ru)

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН, Московская обл. Пущино, Россия 142290 Московская обл. г. Пущино, ул. Научная д. 3. Россия.

При изучении механизма воздействия биологически активных веществ (БАВ) на структуру биомембран методом ДСК с использованием фосфолипидных мультиламеллярных липосом - модели многослойных клеточных мембран животного происхождения, показано изменение микродоменной организации бислоя, образование в бислое собственной фазы БАВ.

**Ключевые слова:** фосфолипиды, липосомы, ДСК, биологически активные вещества.

В большинстве случаев при воздействии биологически активных веществ (БАВ) первичными мишенями являются мембраны клеток. В качестве простейшей модели, имитирующей клеточную мембрану животного происхождения, использовались мультиламеллярные липосомы диаметром около 1000 нм, представляющие собой множество вложенных друг в друга концентрических бислоевых липосом, убывающих по размеру. Мембраны формировали из димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) - синтетического нейтрального насыщенного фосфолипида в водной среде в присутствии фосфатного буфера при температуре выше фазового перехода фосфолипида, т.е. бислой формируется в фазе жидкого кристалла. Молекулы ДМФХ имеют форму цилиндра, с фосфатной головкой небольшого размера и двумя углеводородными цепями - остатками насыщенной миристиновой кислоты. Строение молекулы ДМФХ позволяет сформировать бислоевые липосомы с небольшой кривизной мембраны [1]. При тестировании термодинамических характеристик ДМФХ методом ДСК [2] по изменению фазовых переходов липидов показано, что в зависимости от структуры и количества применяемого БАВ изменяются структурные свойства фосфолипидных бислоев. Гидрофильный мелафен (меламиновая соль бис (оксиметил)фосфиновой кислоты) стимулятор роста растений, не разрушает структуру мембраны. Выявлена полимодальность зависимости термодинамических характеристик ДМФХ от концентрации мелафена. Гидрофобные производные антиоксиданта фенозана – сложноэфирные производные (метилокса(3,5-дитретбутил-4-гидроксибензилпропановой кислоты) и этаноламина (коламина), замещенного алкильными заместителями с разной длиной цепи 8; 10; 12; 16 углеродных атомов, - ИХФАНЫ изменяют микродоменную организацию ДМФХ липосом. ИХФАНЫ в малых концентрациях стабилизируют ДМФХ мембрану, в средних - разрушают. ИХФАН-С16 при концентрациях 10<sup>-5</sup> - 10<sup>-6</sup> М формирует собственную фазу микродоменов в бислое. ИХФАНЫ С10 и С12 максимально меняют микродоменную организацию бислоя без создания собственной фазы, С8 и С16 (в малой концентрации) влияют в меньшей степени. Вероятно, для проявления био-эффектов оптимальной длиной проникающих в бислой алкильных заместителей обладают ИХФАНЫ-С10, -С12. Обнаруженное формирование собственной фазы в мембранах указывает на вероятность модификации мембран с помощью БАВ, в молекулах которых имеются гидрофобные компоненты. При применении в малых и сверхмалых концентрациях водных эмульсий гидрофобных БАВ происходит накопление их в мембранах. И на мембрану уже оказывает влияние не сверхмалое или малое количество вещества, а гораздо большее – увеличенное на несколько порядков. В этом случае можно полагать, что существенное влияние будет оказано на характеристики фазовых переходов липидов в бислое. БАВ могут, таким образом, «сдвигать» температурные оптимумы существования бислоя в фазе жидкого кристалла. Именно в этой фазе активны все мембранные белки. Так с помощью БАВ, применяемых в определенных концентрациях, возможно влиять на функционирование ассоциированных с мембраной и встроенных в мембрану белковых молекул: ферментов, каналов, ионных насосов и ионных обменников.

## Литература:

1. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ М.: Издательство ЛКИ, 2011.- С. 10-280.
2. Privalov, P. L., Plotnikov, V. V. Three generations of scanning microcalorimeters for liquids //Therm. Acta. 1989. Vol. 139. P. 257-277.

UDC 577.1.04;577.15.03.

## STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES: THE PLANT GROWTH STIMULANT MELAFEN AND DERIVATIVES OF ANTIOXIDANT PHENOZAN, INFLUENCES TO MULTILAMELLAR LIPOSOMES AS THE MODELS OF BIOMEMBRANES

O.M. Alekseeva <sup>1</sup>, Yu.A. Kim <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Emanuel Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow, Russia  
119334; Moscow, Kosygina Street 4, E-mail: olgavek@yandex.ru

<sup>2</sup> Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino, Moscow region. Russia.  
142290 Pushchino, Moscow region. Nauchnaya Street 3.

When investigations of biological active substances (BAS) influences to biomembranes structure by DSC method with using of multilamellar liposomes as the models of multilayers cellular membranes of animal's originated, the changes of belayer microdomains organization and formation of BAS specific phase were obtained.

**Key words:** phospholipids, liposomes, DSC, biological active substances.

In most cases, when using of biologically active substances (BAS) was occurred, the primary targets for BAS at the animal's body are the cellular membranes. As the simple model, simulating the cell membrane of animal's origin, the multilamellar liposomes by the diameter about 1000 nm, which are the score of interleaved of concentric bilayer liposomes, descending to size, were used. The membranes are formed from the synthetic neutral saturated phospholipid dimyristoilphosphatidylcholine (DMPC) in water media in the presence of phosphate buffer at a temperature before of phase transition of DMPC phospholipid. At these conditions the bilayer are formed as phase of liquid crystal. The molecule of DMPC has the shape of cylinder, with phosphate head of no sizable and two hydrocarbon chains - of residues of saturated myristic acid. Such architecture of DMPC molecule permits to form of bilayer liposomes with small curvature of membrane [1]. We then test of thermodynamic characteristics by the DSC method [2] on changes of phase transitions of DMPC phospholipids liposomes. It was shown that there were some dependences of DMPC belayer's microdomain organization from structure and the amounts of BAS which was applied. Thus we may to vary the structural properties of phospholipid bilayers. The hydrophilic melafen (the melamine salt of bis (oximethyl) phosphinic acid) - the plant growth stimulant, do not destroy the membrane belayers structure. The polymodal dependences of thermodynamic characteristics of DMPC belayer's microdomain organization from concentration of melafen were found. The next BAS, which were used, are IHFANs - the hydrophobe derivatives of antioxidant phenozan. IHFANs are the complexes ester derivatives of (methiloxa (3, 5 ditretbutil-4-hydroxyphenilpropane acid) of ethanolamine (colamine), which is substituted by alkyl residues with different chain's lengths: 8; 10; 12; 16 of carbon atoms. IHFANs changed the microdomain organization of DMPC multilamellar liposomes. IHFANs when low concentrations stabilized the membranes structure of DMPC multilamellar liposomes. When large concentrations of IHFANs were applauded, the DMPC belayers were destroyed. IHFAN-C16, when concentrations of 10<sup>-5</sup> 10<sup>-6</sup> M, formed its own phase at DMPC bilayer. IHFANs C10 and C12 maximally changed the microdomain organization of DMPC bilayers without creation of its own phases. The influences to microdomain organization of DMPC bilayers of IHFANs-C8 and -C16 (when low concentration) were smaller. Are likely, for bio-effects manifestation there are the optimum of lengths for introduced to DMPC bilayers of alkyl residues. These optimal lengths IHFAN-C10 and IHFAN- C12 have. The data discovered at these experiments of the formation of own phase in membranes by IHFAN-C16 indicate the modification probability of membranes by means of BAS with hydrophobe components in its molecules are available. We may note that, when aqueous emulsions of hydrophobe BAS are using at small and ultra-small concentrations of BAS, the accumulation of BAS occurs in membranes. At these cases amount of BAS already are not of ultra-small and not of low. So much big concentration of BAS influence to membranes – concentration of BAS increased in a few times. In that case it is possible believe that significant influence of certain BAS will be rendered on characteristic of phase transitions of lipids in bilayer. BAS, so that, may <shift> the temperature optimums of the bilayer existence in phase

as liquid crystal. Precisely, when the liquid crystals phase existence, all membrane components are at activate state, its may be stimulated quickly. So by means of specific BAS, that are applied when certain concentrations, it is possible to influence to functioning of the protein molecules, which are membrane-associated and are integrated into membrane: enzyms, channels, ion pumps and ionic exchangers.

References:

1. Tarachovsky U. S. Intellectual containers for target transitions of medical substances. M. LKI, 2011. P.10-280.
2. Privalov, P. L., Plotnikov, V. V. Three generations of scanning microcalorimeters for liquids //Therm. Acta. 1989. Vol. 139. P. 257-277.

УДК 577.113.(7+4):547.327

## N-(СУЛЬФОНИЛ)-ФОСФОРАМИДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИСМЫСЛОВЫЕ АГЕНТЫ

Челобанов Б.П., <sup>1,2</sup> Буракова Е.А., <sup>1</sup> Прохорова Д.В., <sup>1,2</sup> Захрямина А.Е., <sup>2</sup> Ван М., <sup>2</sup> Держалова А.Ш., <sup>2</sup> Фокина А.А., <sup>1</sup> Стеценко Д.А. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия  
 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, 8  
 dast@niboch.nsc.ru

Новые N-(сульфонил)-фосфорамидные олигонуклеотиды (СФО) проявили перспективные свойства как потенциальные антисмысловые терапевтические агенты. Мезилфосфорамидные и N-(1-гексансульфонил)-фосфорамидные олигодезоксинуклеотиды активируют РНКазу Н. Последние также способны проникать в клетки млекопитающих в отсутствие трансфекционного агента.

**Ключевые слова:** антисмысловые (антисенс) олигонуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аналоги ДНК, РНКазы Н, проникновение в клетку

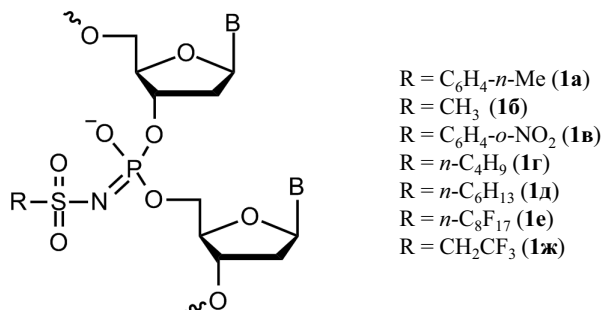


Рис. 1. Структура N-(сульфонил)-фосфорамидных олигонуклеотидов (СФО).

Ряд производных ДНК с модифицированными фосфатными группами нашел применение в медицине как антисмысловые терапевтические препараты. К этой группе соединений можно отнести N-(сульфонил)-фосфорамидные олигонуклеотиды (СФО). Однако, их сродство к РНК до недавнего времени не было исследовано, и потенциал этих соединений как антисмысловых терапевтических агентов оставался неизвестным.

Недавно в нашей лаборатории были впервые получены производные ДНК, в которых одна или более межнуклеотидных фосфатных групп замещены тозилфосфорамидными группами (рис. 1, 1а) [1]. Данные соединения способны образовывать комплементарные дуплексы как с ДНК, так и с РНК, однако устойчивость этих дуплексов несколько уступала устойчивости дуплексов природных олигодезоксинуклеотидов. В то же время комплементарные дуплексы, образуемые олигодезоксинуклеотидами, содержащими мезилфосфорамидные группы (1б), с ДНК или РНК, лишь незначительно отличаются по своей устойчивости от дуплексов, образуемых природными олигодезоксинуклеотидами [2]. Был также впервые осуществлен синтез аналогов ДНК, полностью замещенных по всем межнуклеотидным положениям мезил- и тозилфосфорамидными группами, а также рядом других N-(сульфонил)-фосфорамидных групп (рис. 1, 1в-ж) [3]. Нами было впервые показано, что как мезилфосфорамидные, так и N-(1-гексансульфонил)-фосфорамид-

ные олигодезоксинуклеотиды (1д) могут индуцировать расщепление РНК в составе образуемого ими гетеродуплекса путем активации РНКазы Н с эффективностью, сопоставимой с таковой у нативных олигодезоксинуклеотидов [3]. N-(1-Гексансульфонил)-фосфорамидные олигодезоксинуклеотиды (1д) оказались также способными проникать в некоторые клеточные линии млекопитающих в отсутствие трансфекционного агента.

Это позволяет рассматривать новые аналоги ДНК, содержащие N-(сульфонил)-фосфорамидные группы во всех межнуклеотидных положениях, как перспективную основу для создания антисмысловых терапевтических препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 15-29-01334 и 16-03-01055) и Базового проекта ПФНИ ГАН на 2017-2020 гг. (VI.62.1.3, 0309-2016-0005) «Терапевтические нуклеиновые кислоты». Синтез модифицированных олигонуклеотидов проводился за счет гранта РНФ № 17-44-07003.

#### Литература:

1. Прохорова Д.В., Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Фокина А.А., Стеценко Д.А. Новые производные олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие межнуклеотидную N-тозилфосфорамидную группу: синтез и взаимодействие с комплементарными последовательностями ДНК и РНК // *Биоорганическая химия*. – 2017. – Т. 43. – № 1. – С. 45-50.
2. Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Прохорова Д.В., Фокина А.А., Стеценко Д.А. Новые производные олигодезоксинуклеотидов, содержащие межнуклеотидную N-(метансульфонил)-фосфорамидную (месилфосфорамидную) группу. // *Биоорганическая химия*. – 2017. – Т. 43. – № 6. – С. 644-649.
3. Стеценко Д.А., Челобанов Б.П., Фокина А.А., Буракова Е.А. Модифицированные олигонуклеотиды, активирующие РНКазу Н. // Заявка на патент РФ № 2017105743, 21.02.2017.

УДК 577.113.(7+4):547.327

## N-(SULFONYL)-PHOSPHORAMIDATE OLIGONUCLEOTIDES: NEW PROMISING ANTISENSE AGENTS

Chelobanov B.P., <sup>1,2</sup> Burakova E.A., <sup>1</sup> Prokhorova D.V., <sup>1,2</sup> Zakhryamina A.E., <sup>2</sup> Wang M., <sup>2</sup> Derzhalova A.S., <sup>2</sup> Fokina A.A., <sup>1</sup> Stetsenko D.A. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

630090, Novosibirsk, Lavrentiev Avenue, 8

dast@niboch.nsc.ru

New N-(sulfonyl)-phosphoramidate oligonucleotides (SPO) have shown promising properties as potential antisense therapeutic agents. Mesityl phosphoramidate and N-(1-hexanesulfonyl)-phosphoramidate oligodeoxynucleotides activate RNase H. The latter type is also able to penetrate into mammalian cells in the absence of transfecting agent.

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

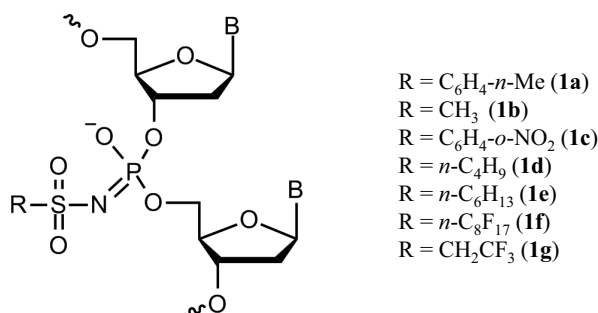


Fig. 1. The structure of N-(sulfonyl)-phosphoramidate oligonucleotides (SPO).

Several DNA derivatives with modified phosphate groups have found their application in medicine as antisense therapeutics. This group of compounds include N-(sulfonyl)-phosphoramidite oligonucleotides (SFD). However, their affinity for RNA, until recently, have not been investigated and the potential of these compounds as antisense

therapeutics remained unclear.

Recently in our laboratory DNA derivatives were obtained for the first time in which one or more internucleotidic phosphate groups were replaced by tosyl phosphoramidate groups (Fig. 1, 1a) [1]. These compounds were shown to form complementary duplexes with DNA or RNA. However, their stability was inferior to that of natural oligodeoxynucleotide duplexes. At the same time, complementary duplexes formed by oligodeoxynucleotide containing mesyl phosphoramidate group (1b) with DNA or RNA, differ only slightly in their stability from the duplexes formed by natural oligodeoxynucleotide [2]. We have also carried out for the first time the synthesis of DNA analogues substituted at all internucleotidic positions by mesyl or tosyl phosphoramidate groups as well as a number of other N-(sulfonyl)-phosphoramidate groups (Fig. 1, 1a-g) [3]. We have shown that mesyl phosphoramidate and N-(1-hexanesulfonyl)-phosphoramidate oligodeoxynucleotides (1e) can induce RNA cleavage in a heteroduplex formed by them via activation of RNase H with efficiency comparable to that of native oligodeoxynucleotide [3]. N-(1-Hexanesulfonyl)-phosphoramidate oligodeoxynucleotide (1e) was also able to penetrate into some mammalian cell lines in the absence of transfecting agent.

This allows one to consider novel DNA analogues containing N-(sulfonyl)-phosphoramidate groups in all internucleotidic positions as a promising platform for designing antisense therapeutics.

This work was funded by RFBR (grants №№ 15-29-01334 and 16-03-01055) and partially by the Russian Government funded budget project VI.62.1.3, 0309–2016–0005 (2017–2020) “Therapeutic nucleic acids”. Syntheses of modified oligonucleotides were supported by RSF grant № 17-44-07003.

*References:*

1. Prokhorova D.V., Chelobanov B.P., Burakova E.A., Fokina A.A., Stetsenko D.A. New oligodeoxyribonucleotide derivatives bearing internucleotide N-tosyl phosphoramidate groups: synthesis and complementary binding to DNA and RNA // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2017. – Vol. 43. – No. 1. – P. 39-43.
2. New Oligodeoxynucleotide Derivatives Containing N-(Methanesulfonyl)-Phosphoramidate (Mesyl Phosphoramidate) Internucleotide Group. Chelobanov B.P., Burakova E.A., Prokhorova D.V., Fokina A.A., Stetsenko D.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2017. – V. 43. – No. 6. – P. 664–668.
3. Stetsenko D.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Burakova E.A. Modified oligonucleotides that activate RNase H. // *Russian patent application No. 2017105743, February 21, 2017.*

# ТЕРАПИЯ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ВИРУСОВ

## USING VIRUSES AS CANCER TREATMENT

1. ВИРУСЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ И ВОЗМОЖНОСТИ, Нетёсов С.В., М.В.Романенко, Г.В.Кочнева .....	115
VIRUSES FOR CANCER THERAPY: NEW PERSPECTIVES AND OPPORTUNITIES, S.V. Netesov, M.V. Romanenko, G.V. Kochneva .....	116
2. ИЗУЧЕНИЕ НЕПАТОГЕННЫХ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6 КРЫСЫ, Сосновцева А.О., Липатова А.В., Желтухин А.О., Кочетков Д.В. ....	117
STUDY OF NON-PATHOGENIC ONCOLYTIC HUMAN ENTEROVIRUSES ON THE MODEL OF RAT GLYOMA С6 CELLS, Sosnovtseva A.O., Lipatova A.V., Zheltukhin A.O., Kochetkov D.V. ....	118
3. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ ОНКОТОКСИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, Кочнева Г.В., Рихтер В.А., Рябчикова Е.И., Нетесов С.В. ....	119
ANTITUMOR POTENTIAL OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUS EXPRESSING THE ONCOTOXIC PROTEINS GENES, Kochneva G.V., Richter V.A., Ryabchikova E.I., Netesov S.V. ....	120
4. РЕКОМБИНАНТНЫЕ АДЕНОВИРУСЫ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ В КАЧЕСТВЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ, Романенко М. В., Осипов И. Д., Сизова М. А., Нетёсов С. В. ....	121
RECOMBINANT ADENOVIRUSES: POSSIBILITIES AND PROSPECTS AS ONCOLYTIC AGENTS, Romanenko M. V.1, Osipov I. D., Sizova M. A., Netesov S. V. ....	122

УДК 578.5

## ВИРУСЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ И ВОЗМОЖНОСТИ

Нетёсов С.В. <sup>1</sup>, М.В.Романенко <sup>1,2</sup>, Г.В.Кочнева <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФБУН «ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово Новосибирской обл., Россия  
Адрес для переписки: 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2, оф.232А, svn15@hotmail.com

Описаны история и современное состояние разработок в области онколитических вирусов. Представлена информация о направлениях разработок в разных странах.

**Ключевые слова:** виротерапия рака, онколитические вирусы, генная терапия, терапевтические микроорганизмы, вирусная терапия рака

Вирусы и бактерии, способные селективно и эффективно лизировать раковые клетки, многие годы являлись предметом мечты врачей-онкологов, поскольку еще в начале 20 века были отмечены случаи исчезновения опухолей после инфекционных заболеваний вирусной или бактериальной природы. Однако, из-за трудно предсказуемой эффективности такого метода лечения, невыясненных до конца причин образования и развития опухолей и отсутствия до сравнительно недавнего времени методов получения специально сконструированных для этих целей рекомбинантных вирусов этот подход начал серьезно развиваться лишь в конце 90-х годов прошлого столетия. Но уже к 2007 году в Китае к массовому применению для лечения рака были разрешены два рекомбинантных штамма аденовируса под названиями Онкорин и Гендицин. В США в течение двух последних десятилетий были проведены более 50 клинических испытаний различных онколитических вирусов, а в 2015 году там же впервые в истории Управлением по контро-

лю лекарств и пищи (FDA) было разрешено широкое клиническое использование рекомбинантного аттенуированного штамма герпес-вируса (Имлиджик, Imlygic) для лечения меланомы и клинические испытания 3 фазы противоракового препарата на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины (Pexa-Vec). На очереди – рекомбинантные штаммы парамиксовирусов, реовирусов, аденовирусов и энтеровирусов. В России в 2007 году в РОНЦ им. Н.Н.Блохина были относительно успешно проведены клинические испытания 1 фазы онколитического рекомбинантного аденовируса 1 поколения, но средств на 2 фазу найти так и не удалось.

Основы избирательного лизиса клеток опухолей вирусами к настоящему времени во многом прояснены и состоят в следующем:

1. Онколитические вирусы избирательно поражают раковые клетки, которые используют отличные от обычных метаболические пути;

2. Онколитические вирусы атакуют опухолевые клетки благодаря специально внесенным в геномы вирусов мутациям или встроенным специально генам, в результате чего прямо или опосредованно гибнут раковые клетки;

3. Инфекция раковых клеток онколитическими вирусами индуцирует противоопухолевый иммунитет.

Применяемые в настоящее время онколитические вирусы можно разделить на три категории: дикие, природные вирусы животных, которые обычно не инфицируют нормальные клетки человека, но являются цитотоксичными для дефектных опухолевых клеток; аттенуированные вирусы, специфически нацеленные на раковые клетки; и вирусы со значительным по размеру геномом, в который внесены изменения, ограничивающие их размножение в нормальных клетках, и в который встроены гены цитотоксических или усиливающих противоопухолевый иммунитет белков.

В итоге к настоящему времени сформировалось новое направление в терапии рака в виде онколитических вирусов, оно активно развивается в США, Японии, Германии, Китае, Финляндии, а в некоторых из этих стран развернулись их широкие клинические испытания с одобрением на уровне государственных органов здравоохранения. Испытания рекомбинантного онколитического штамма вируса осповакцины, в геном которого встроены гены гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, сейчас проходят в более чем в 100 больницах 15 стран мира (сайт [www.pexavetrials.com](http://www.pexavetrials.com)). А клинический центр с наибольшим количеством экспериментального применения онколитических вирусов – это больница Mayo Clinic в Рочестере, Миннесота, США, где в лечебных целях исследуются модифицированные и природные штаммы вирусов нескольких семейств, и некоторые успешные результаты уже опубликованы. Аналогичные разработки начинают реализовываться в Москве в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН и в Новосибирске: в Новосибирском государственном университете, ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» и Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

UDC 578.5

## VIRUSES FOR CANCER THERAPY: NEW PERSPECTIVES AND OPPORTUNITIES

Sergey V. Netesov<sup>1</sup>, Margarita V. Romanenko<sup>1,2</sup>, Galina V. Kochneva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk, Region, Russia  
Mailing address: Novosibirsk, 630090, Pirogov St., 2, office 232A, [svn15@hotmail.com](mailto:svn15@hotmail.com)

The history and current state-of-the-art of the research and development in the field of oncolytic viruses are described. The information about types and mechanisms of actions of these viruses is presented together with situation of clinical trials in different countries.

**Key words:** cancer virotherapy, oncolytic viruses, gene therapy of cancer, therapeutic viruses, viral cancer therapy

Micromachines, micro-robots or microorganisms capable to selectively and effectively lyse cancer cells have been a subject of dreams of generations of oncologists for decades because the first cases of recoveries of cancer patients as a result of microbial infections were described since the beginning of 20 century. Because of poorly predicted effectiveness of this approach, the intensive development of this type of treatment started about 20 years ago only. However, in 2005-2007 two different recombinant adenovirus-based anticancer drugs - Oncorine and Gendicine - were officially approved for cancer treatment in China. The reasons of selective lysis of cancer cells by viruses had been substantially clarified during the last ten years, and now we know the following:

1. The oncolytic viruses selectively infect cancer cells because these cells use metabolic ways which differ from those normal cells use;

2. The oncolytic viruses do not attack normal cells and attack specifically cancer cells because these viruses have special mutations in their genomes or intentionally inserted genes which make them specific to cancer cells and specifically kill them;

3. The infection of cancer cells by viruses induces tumor-specific immunity.

The modern oncolytic viruses may be divided into three different categories: wild or natural animal virus strains which usually do not infect healthy human cells but are cytotoxic for cancer cells; attenuated human viruses which are specifically selected to kill cancer cells; and non-pathogenic human viruses with significant by size genome in which special cancerolytic genes are inserted and in which special attenuating mutations are introduced.

The oncolytic viruses are being developed now in the USA, Japan, China, Germany, Finland and some other countries. During the two last decades, more than 50 different clinical trials of oncolytic viruses were conducted in the USA alone. And in 2015 the US Food and Drug Administration officially, for the first time in the history, approved wide Phase 3 clinical trials of attenuated recombinant strain of herpesvirus (Imlygic) for treatment of melanoma and also wide clinical trials of recombinant vaccinia virus (Pexa-Vec) for liver cancer treatment. The limited, Phase 2, clinical trials were also approved for some attenuated or non-pathogenic for humans strains of the following virus families: Paramyxoviridae, Picornaviridae, Reoviridae and Adenoviridae. A substantial number of Phase 1-2 clinical trials is being performed at the Mayo Clinic – the cancer treatment center #1 of the USA according to the national ranking of hospitals in this country.

In Russia in 2007, the quite successful Phase 1 clinical trials of the recombinant oncolytic type 5 adenovirus strain were performed at the Russian Federal Oncological Research Center named after N.N. Blokhin. Nevertheless, researchers were unlucky in obtaining funding for Phase 2 clinical trials because of financial crisis in 2008. But because of the megagrant funding during 2010-2012, the development of the oncolytic viruses in Russia started in Moscow in the Engelhardt Institute of Molecular Biology of RAS, and in Novosibirsk: at the State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Novosibirsk State University and the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS. Some significant achievements of the research of these centers will be presented in the following reports.

УДК 578.5

## ИЗУЧЕНИЕ НЕПАТОГЕННЫХ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ЭНТЕРОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИ КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6 КРЫСЫ

Сосновцева А.О. <sup>1,2</sup>, Липатова А.В. <sup>2</sup>, Желтухин А.О. <sup>2</sup>, Кочетков Д.В. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Российский национальный медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Минздрава РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1;

<sup>2</sup> ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, д.32.  
e-mail: aososnovtceva@gmail.com

На модели клеток глиомы С6 крысы, несущих специфические вирусные рецепторы человека была показана цитолитическая активность непатогенных энтеровирусов человека (полиовирусов и вируса Коксаки В5) в тестах *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что онколитическая активность вирусов зависит от повреждений систем интерфероновой защиты клеток.

**Ключевые слова:** онколитические вирусы, злокачественные глиобластомы, виро-терапия, интерферон.

На сегодняшний день, благодаря значительному прогрессу в понимании механизмов злокачественной трансформации, ведется активная работа по разработке персонифицированных подходов к терапии онкологических заболеваний, в частности, разработка новых таргетных противоопухолевых препаратов. Одним из перспективных подходов является терапия на основе онколитических вирусов, которые направлены на специфические маркеры опухолевых клеток. Онколитические вирусы обладают способностью к селективному уничтожению опухолевых клеток, не повреждая нормальные клетки организма [1]. Непатогенные штаммы энтеровирусов рассматриваются как возможные агенты в онколитической терапии различных опухолей, в том числе злокачественных глиобластом [2]. Селективность действия энтеровирусов-онколитиков, в первую очередь, обеспечивается за счет наличия на клетках специфических рецепторов [3], а также может зависеть от различных генетических повреждений, приводящих к нарушениям механизмов неспецифической противовирусной защиты клеток [4].



Целью данной работы было изучение онколитической активности непатогенных штаммов энтеровирусов человека на модели клеток глиомы С6 крысы с экзогенной экспрессией вирусных рецепторов человека (полиовирусного рецептора PVR или рецептора Коксаки и аденовирусов CAR) и исследование влияния клеточной интерфероновой системы на активность вирусов. Нами было показано, что онколитическая активность непатогенных штаммов полиовирусов и вируса Коксаки В5 требовала презентация на поверхности клеток глиомы С6 рецепторов PVR и CAR человека соответственно и значительно повышалась при повреждении механизмов интерферонного ответа. Так нокаут гена субъединицы 1 рецептора интерферона  $\alpha/\beta$  в клетках С6 приводил к увеличению репликации вируса в этих клетках. Также на модели подкожных ксенографтов из клеток С6, несущих PVR, была показана противоопухолевая активность вакцинного штамма полиовируса 3 типа.

Таким образом, использование онколитических непатогенных энтеровирусов человека является перспективным подходом в противоопухолевой биотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Образования и Науки РФ в рамках Соглашения о предоставлении субсидии № 14.607.21.0014, уникальный идентификатор проекта - RFMEFI60714X0014

*Литература:*

1. Chiocca E. A., Rabkin S. D. *Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy //Cancer immunology research.* – 2014. – Т. 2. – №. 4. – С. 295-300.
2. Чумаков П. М. и др. Онколитические энтеровирусы //Молекулярная биология. – 2012. – Т. 46. – №. 5. – С. 712-712.
3. Сосновцева А. О. и др. Чувствительность клеток глиомы С6, несущих полиовирусный рецептор человека, к онколитическим полиовирусам //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161. – №. 6. – С. 780-784.
4. Groner B., von Manstein V. *Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition.* – 2017.

UDC 578.5

## STUDY OF NON-PATHOGENIC ONCOLYTIC HUMAN ENTEROVIRUSES ON THE MODEL OF RAT GLIOMA C6 CELLS

Sosnovtseva A.O. <sup>1,2</sup>, Lipatova A.V. <sup>2</sup>, Zheltukhin A.O. <sup>2</sup>, Kochetkov D.V. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianov str. 1, Moscow, Russia, 117997;

<sup>2</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Vavilova str. 32, Moscow, Russia, 119991  
e-mail: aososnovtseva@gmail.com

The cytolytic activity of nonpathogenic human enteroviruses (polioviruses and Coxsackievirus B5 virus) was demonstrated in experiments in vitro and in vivo on the model of rat glioma C6 cells expressing specific human viral receptors. It was shown that the oncolytic activity of enteroviruses strongly depends on the effectiveness of interferon response system in host cells.

**Key words:** oncolytic viruses, malignant glioblastomas, virotherapy, interferon.

Due to significant progress in understanding of the malignant transformation mechanisms new personalized cancer therapies, in particular, targeted antitumor drugs, are actively develop. One of the promising approaches is based on nonpathogenic oncolytic viruses, aiming at specific targets of tumor cells. Oncolytic viruses are able selectively destroy tumor cells without any damage for normal cells [1]. Nonpathogenic strains of enteroviruses are considered as possible oncolytic agents with wide spectrum, including malignant glioblastomas [2]. The selectiveness of ontocolytic enteroviruses is primarily due to the presence of specific receptors on the cells [3] and may also depend on various genetic defects leading to disorders of the nonspecific antiviral protection mechanisms [4].

The aim of this work was to study the oncolytic activity of nonpathogenic strains of human enteroviruses on a model of rat glioma C6 cells with exogenous expression of human viral receptors (poliovirus receptor - PVR or Coxsackie and adenovirus receptor - CAR) and to study the effect of host-cell interferon response system on virus activity. We have shown that the oncolytic activity of nonpathogenic strains of polioviruses and the Coxsackievirus B5 necessitate the human PVR and CAR receptors on the surface of rat glioma C6 cells, respectively, and oncolytic activity was significantly increased when the interferon response mechanisms were damaged. Thus knockout of

interferon  $\alpha/\beta$  receptor subunit 1 gene (*ifnar1*) in C6 cells led to an increase of viral replication. Also, the antitumor activity of the vaccine strain of type 3 poliovirus was demonstrated on the model of subcutaneous xenografts of C6 cells carrying human PVR.

Thus, the use of oncolytic non-pathogenic human enteroviruses is a promising approach in antitumor biotherapy.

The work was financially supported by Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project no. RFMEFI60714X0014)

References:

1. Chiocca E. A., Rabkin S. D. *Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy* // *Cancer immunology research*. – 2014. – Т. 2. – №. 4. – С. 295-300.
2. Chumakov P. M. et al. *Oncolytic enteroviruses* // *Molecular Biology*. – 2012. – Т. 46. – №. 5. – С. 639-650.
3. Sosnovtseva A. O. et al. *Sensitivity of C6 Glioma Cells Carrying the Human Poliovirus Receptor to Oncolytic Polioviruses* // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2016. – Т. 161. – №. 6. – С. 821.
4. Groner B., von Manstein V. *Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition*. – 2017.

УДК 577.21

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПОТЕНЦИАЛ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ ОНКТОКСИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Кочнева Г.В. <sup>1,3\*</sup>, Рихтер В.А. <sup>2</sup>, Рябчикова Е.И. <sup>2</sup>, Нетесов С.В. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия, 630559, р.п.Кольцово, Новосибирская область, Россия

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия, 630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

\* e-mail: g.v.kochneva@yandex.ru

Представлены данные о конструировании препаратов на основе онколитического вируса осповакцины. Показана высокая противоопухолевая эффективность полученных препаратов.

**Ключевые слова:** вирус осповакцины; онколитические вирусы; апоптин; лактаптин.

Конструирование рекомбинантных штаммов вируса осповакцины (ВОВ) с целью создания на их основе противоопухолевых препаратов является перспективным направлением биотехнологии. Ряд таких штаммов в настоящее время успешно проходят клинические испытания за рубежом. ВОВ обладает природной онкоселективностью, однако ее уровень зависит от штамма вируса. В наших исследованиях показано, что индекс селективности российского штамма Л-ИВП (GenBank Acc. KP233807.1) составляет больше 1000 в паре гомологичных культур клеток эпителия молочной железы раковая/нормальная MCF7 / MCF 10A. Штамм Л-ИВП способен не только вызывать прямую деструкцию опухолевых клеток, но также останавливать их деление в S-фазе клеточного цикла.

На основе штамма Л-ИВП нами был сконструирован ряд рекомбинантных штаммов с делециями генов тимидинкиназы (ТК) и ростового фактора (VGF, virus growth factor). Эти гены кодируют факторы вирулентности, и их удаление приводит к практически полной неспособности вируса реплицироваться в нормальных неделящихся клетках, но при этом сохраняется литическая активность в отношении раковых. Для усиления противоопухолевой активности в район делеции гена VGF проведена встройка трансгенов онкотоксических белков – апоптина (Apo), NS1 парвовируса (NS1) или лактапина (Lact). Показано, что эти белки обладают адресной апоптоз-индуцирующей активностью в отношении опухолевых клеток человека. Поскольку при лизисе раковых клеток происходит высвобождение ассоциированных с опухолью антигенов, которые, как известно, являются слабо иммуногенными, необходимо введение дополнительного иммуностимулирующего цитокина. Лучшим на данный момент является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ). Ген ГМКСФ человека был встроен в район делеции гена ТК. Таким образом, сконструированы три двойных рекомбинантных штамма Л-ИВП с фенотипом ТК-ГМКСФ+VGF-Apo+/NS1+/Lact+.

Все рекомбинантные штаммы показали высокую цитотоксическую активность и онкоселективность в отношении раковых клеток человека как *in vitro*, так и *in vivo*. Методами проточной цитометрии и иммуно-

гистохимии показано, что рекомбинанты эффективно индуцирует апоптоз раковых клеток человека. Ингибирование роста опухолей разного генеза и выживаемость продемонстрированы в иммунодефицитных и иммунокомпетентных мышинных моделях при интратуморальном и внутривенном введении рекомбинантных вирусов. Строгая внутриопухолевая репликация вирусов и антиметастатический эффект показаны на модели искусственного метастазирования эпидермоидной карциномы человека A431 на мышах линии nude с использованием методов электронной микроскопии и In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker). Экспрессия гена ГМ-КСФ стимулирует миграцию эффекторных клеток иммунной системы в разрушенную вследствие репродукции вирусов опухолевую ткань. Экспрессия генов онкотоксических белков усиливает этот эффект.

UDC 577.21

## ANTITUMOR POTENTIAL OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUS EXPRESSING THE ONCOTOXIC PROTEINS GENES

Kochneva G.V. <sup>1,3</sup> \*, Richter V.A. <sup>2</sup>, Ryabchikova E.I. <sup>2</sup>, Netesov S.V. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Russia, 630559, Koltsovo, Russia, Novosibirsk Region, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of SB RAS, Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentieva Ave., 8

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Russia, 630090, Novosibirsk, St. Pirogova, 1

\* e-mail: g.v.kochneva@yandex.ru

Data are presented on the design of preparations based on the oncolytic vaccinia virus. The high antitumor efficacy of the preparations obtained is shown.

**Key words:** vaccinia virus; oncolytic viruses; apoptin; lactaptin.

The construction of recombinant strains of the vaccinia virus (VV) with the aim of creating antineoplastic agents based on them is a promising direction of biotechnology. A number of such strains are currently successfully undergoing clinical trials abroad. VV has a natural oncoselectivity, but its level depends on the strain of the virus. Our studies show that the selectivity index of the Russian strain of L-IVP (GenBank Acc. KR233807.1) is more than 1000 in a pair of homologous cultures of breast cancer epithelium cancer / normal MCF7 / MCF 10A. The L-IVP strain is able not only to cause direct destruction of tumor cells, but also to stop their division in the S-phase of the cell cycle.

Based on the L-IVP strain, we constructed a number of recombinant strains with thymidine kinase (TK) and growth factor (VGF, virus growth factor) gene deletions. These genes encode virulence factors, and their removal leads to a virtually complete inability of the virus to replicate in normal non-dividing cells, but the lytic activity against cancerous cells remains intact. To enhance the antitumor activity in the deletion region of the VGF gene, the transgene of oncotoxic proteins - apoptin (Apo), NS1 parvovirus (NS1) or lactaptin (Lact) was inserted. It was shown that these proteins have targeted apoptosis-inducing activity against human tumor cells. Since the cancer cells are lysed, release of tumor-associated antigens, which are known to be weakly immunogenic, requires the introduction of an additional immunostimulatory cytokine. The best at the moment is a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). The human GM-CSF gene was inserted into the deletion region of the TK gene. Thus, three double recombinant L-IVP strains with the phenotype TK-GM-CSF + VGF-Apo + / NS1 + / Lact + were constructed.

All recombinant strains showed high cytotoxic activity and oncoselectivity for human cancer cells both in vitro and in vivo. Methods of flow cytometry and immunohistochemistry have shown that recombinants effectively induce apoptosis of human cancer cells. Inhibition of tumor growth of different genesis and survival was demonstrated in immunodeficient and immunocompetent mouse models with intratumoral and intravenous administration of recombinant viruses. Strict intratumoral viral replication and antimetastatic effect are shown in the artificial metastasis model of human epidermoid carcinoma A431 in nude mice using electron microscopy and the In-vivo Multispectral Imaging System (Bruker). Expression of the GM-CSF gene stimulates the migration of the effector cells of the immune system to the tumor tissue destroyed by the reproduction of viruses. Expression of oncotoxic protein genes enhances this effect.

УДК 578.5

## РЕКОМБИНАНТНЫЕ АДЕНОВИРУСЫ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ В КАЧЕСТВЕ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

Романенко М. В.<sup>1,2</sup>, Осипов И. Д.<sup>1</sup>, Сизова М. А.<sup>1</sup>, Нетёсов С. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> ФБУН «ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово Новосибирской обл., Россия

630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2, к. 317

e-mail: tarasovamv@gmail.com

По результатам клинических испытаний аденовирусы зарекомендовали себя как безопасные и в ряде случаев эффективные онколитики. Модифицируя их геном предложенным нами способом можно конструировать рекомбинанты с повышенной специфичностью к опухолевым клеткам и высоким онколитическим потенциалом благодаря встроенным трансгенам.

**Ключевые слова:** онколитические вирусы, аденовирусы, генетическая инженерия вирусов, вирусная терапия рака, трансгены.

Рекомбинантные аденовирусы – одни из самых перспективных на сегодняшний день онколитических вирусов. Их привлекательность в качестве противоопухолевых агентов объясняется рядом их свойств: они слабо- или непатогенны для человека, способны инфицировать широкий круг клеток, относящихся к различным тканям, а также имеют геном в виде двуцепочечной ДНК, что удобно для всевозможных генетических манипуляций. При этом их геном не встраивается в хромосомы клетки-хозяина, а, кроме того, аденовирусные суспензии устойчивы к перепадам температуры, что облегчает их хранение и транспортировку.

Механизм действия онколитических аденовирусов, как и представителей других вирусных семейств, включает в себя лизис опухолевых клеток, в результате которого высвобождаются DAMP (англ. danger associated molecular patterns), PAMP (англ. pathogen-associated molecular patterns), а также опухолевые антигены, включая неоантигены, что приводит к активации системного противоопухолевого иммунного ответа [1].

В целом, если посмотреть на схему отличительных особенностей опухолевых клеток (“Hallmarks of cancer”) Ханана и Вайнберга, то можно увидеть, что аналогичные отличительные особенности прослеживаются у нормальных клеток, зараженных аденовирусами. Таким образом, если инактивировать некоторые из генов аденовируса, ответственных за развитие таких изменений в клетках, можно создать рекомбинантный вариант, способный заражать лишь опухолевые клетки [2]. Самый первый пример такой модификации для повышения специфичности аденовируса к опухолевым клеткам – ONYX-015, аденовирус серотипа 5 с делецией гена E1B-55K. Сейчас для ограничения размножения аденовирусов только опухолевыми клетками используют несколько стратегий, среди них использование химерных фибрилл для нацеливания на опухолеспецифические поверхностные маркеры, различные делеции в генах E1A и E1B (ключевых генах для репликации вируса), а также использование опухоле- и тканеспецифических промоторов для регуляции указанных генов. Для усиления же литических, а также иммуностимулирующих и других полезных свойств для борьбы с опухолью в аденовирусы встраивают различные трансгены (гены цитокинов, цитотоксических белков, регуляторов апоптоза и другие).

Несмотря на то, что получением рекомбинантных аденовирусов занимается большое число лабораторий по всему миру, внесение изменений в геномы протяженностью около 30 тыс. пн все еще остается довольно трудоемкой задачей. Если для самого распространенного серотипа 5 имеется несколько коммерческих наборов для внесения модификаций в его геном, то при работе с альтернативными серотипами, использование которых становится все более актуальным в связи с необходимостью расширения тропности вирусов и ускользания от уже имеющейся иммунной памяти у пациентов, необходимо разрабатывать быстрые и эффективные способы изменения геномов. В нашей работе мы используем аденовирус серотипа 6, обладающий высоким онколитическим потенциалом, что было показано нами в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Нами был разработан быстрый и эффективный метод получения геномов с нужными модификациями на основе системы *in vitro* рекомбинации In-Fusion. Суть метода заключается в получении шаттл-плазмиды, содержащей встраиваемый трансген, гидролизе генома по подходящему уникальному сайту, рекомбинации *in vitro* генома с линейаризованной шаттл-плазмидой и последующей трансформации клеток *E. coli*. Из полученной таким образом плазмиды затем вырезается полная копия генома с необхо-

димой модификацией для последующей трансфекции клеток A549.

Разработанный метод позволяет получать различные варианты аденовирусов (потенциально – любых серотипов) с необходимыми модификациями, затрагивающими не только области генома E1A и E3, как наиболее часто используемые для встройки трансгенов, но и другие. В частности, это даст возможность модифицировать поверхностные белки аденовирусов, связывающиеся с рецепторами клеток-мишеней, что позволит расширить тканевую специфичность данных противоопухолевых агентов.

Литература:

1. Kaufman H.L., Kohlhapp F.J., Zloza A. *Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs* // *Nat. Rev. Drug Discov. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 14, № 9. P. 642–662.
2. Seymour L.W., Fisher K.D. *Oncolytic viruses: finally delivering* // *Br. J. Cancer. Nature Publishing Group*, 2016. Vol. 114, № 4. P. 357–361.

UDC 578.5

## RECOMBINANT ADENOVIRUSES: POSSIBILITIES AND PROSPECTS AS ONCOLYTIC AGENTS

Romanenko M. V.<sup>1,2</sup>, Osipov I. D.<sup>1</sup>, Sizova M. A.<sup>1</sup>, Netesov S. V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk, Region, Russia  
Novosibirsk, 630090, Pirogov St., 2, room 317,  
e-mail: tarasovamv@gmail.com

According to the clinical trials results, adenoviruses have proved to be safe and in some cases effective oncolytics. Using the method of modifying their genome, we proposed, that it is possible to design recombinants with increased specificity for tumor cells and high oncolytic potential due to the insertion of transgenes.

136

**Key words:** oncolytic viruses, adenoviruses, genetic engineering of viruses, viral cancer therapy, transgenes.

Recombinant adenoviruses are one of the most promising oncolytic viruses to date. Their attractiveness as antitumor agents is justified by a number of their properties: they are slightly or non-pathogenic for humans, they are capable to infect a wide range of cells belonging to different tissues, and also have a genome in the form of double-stranded DNA, which is very convenient for all possible genetic manipulations. At the same time, their genome does not integrate into the chromosomes of the host cell, and, in addition, adenovirus suspensions are resistant to slight temperature changes, which facilitates their storage and transport.

The mechanism of action of oncolytic adenoviruses, like that of other viral families, including includes lysis of tumor cells, which releases DAMP (danger associated molecular patterns), PAMP (pathogen-associated molecular patterns), and tumor antigens, including neoantigens, which This leads to the activation of a systemic antitumor immune response [1].

In general, if we look at the scheme of the hallmark of cancer cells ("Hallmarks of cancer") of by Hanahan and Weinberg, we will see that similar distinctive features may be found in normal cells infected with adenoviruses. Thus, if you inactivate some of the adenovirus genes responsible for developing such changes in cells, you can construct a recombinant variants that can infect only tumor cells [2]. The very first example of such a modification which increase the specificity of adenovirus to tumor cells is ONYX-015, adenovirus serotype 5 strain with deletion of the E1B-55K gene. Currently, several strategies are used to limit the proliferation of adenoviruses only by to tumor cells, including the use of chimeric fibers for targeting tumor-specific surface markers, various deletions in the E1A and E1B genes (key genes for viral replication), and the use of tumor and tissue-specific promoters to regulate these genes. To strengthen the lytic, as well as immunostimulating and other useful virus properties for fighting the tumor, various transgenes (genes of cytokines, cytotoxic proteins, apoptosis regulators, etc.) may be inserted into adenoviruses.

Despite that the recombinant adenoviruses construction is carrying out by a dozen of laboratories around the world, the introduction of changes in the adenoviral genome is still quite a labor-consuming task. If for the most common serotype 5 therefore a few commercial kits for modifying its genome of the most common serotype 5 were developed by biotech companies. However, for the alternative serotypes (their use is becoming more urgent due to the need to expand the viral tropism and to escape from the already existing immune memory in patients) it is necessary to develop rapid and effective ways of changing alternative serotypes' genomes. In fact, the need for it is becoming more urgent due to the willing to expand the viral tropism and to escape from the already existing

immune memory in patients. In our work, we use adenovirus serotype 6, which has a high oncolytic potential, of which was shown in vitro and in vivo by our laboratory. As a result, we succeeded in developing a fast and effective method for adenovirus genome recombinants construction based on the In-Fusion recombination system. The essence of the method consists of obtaining a shuttle plasmid containing necessary transgene, hydrolysis of the genome at a suitable unique site, in vitro recombination of the genome with a linearized shuttle plasmid, and subsequent transformation of E.coli cells. From the obtained plasmid a complete DNA copy of the genome with the necessary modifications may be further excised from the obtained plasmid for subsequent transfection of A549 cells.

The developed method allows to obtaining various variants of adenoviruses (potentially - of any serotypes) with all the necessary genome modifications. Using it, you may modify not only E1A and E3 genome regions, as most often which are widely used for the insertions of transgenes, but others as well. In particular, this will make it possible to modify the adenovirus surface proteins of adenoviruses that to modify binding to target cell receptors, which will allow the tissue specificity of these oncolytic agents to be expanded.

*References:*

1. Kaufman H.L., Kohlhapp F.J., Zloza A. *Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs // Nat. Rev. Drug Discov.* 2015. Vol. 14. № 9. P. 642–662.
2. Seymour L.W., Fisher K.D. *Oncolytic viruses: finally delivering // Br. J. Cancer.* 2016. Vol. 114. № 4. P. 357–361.

# БИОТЕХНОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

## BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

### БИОБЕЗОПАСНОСТЬ: АНТИБИОТИКИ, ВАКЦИНЫ И МИКРОБИОТА

### BIOSAFETY: ANTIBIOTICS, VACCINES AND MICROBIOTA

1. АМИЛОИДЫ БАКТЕРИЙ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ РОЛИ И СВЯЗЬ С ПАТОГЕНЕЗОМ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ, Нижников А.А., Белоусов М.В., Антонец К.С. ....	127
AMYLOIDS OF BACTERIA: BIOLOGICAL ROLES AND CONNECTION WITH THE PATHOGENESIS OF HUMAN AND ANIMAL INFECTIOUS DISEASES, Nizhnikov A.A., Belousov M.V., Antonets K.C. ....	128
2. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ ОГУРЦА ОТ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ЗЕЛЕННОЙ КРАПЧАТОЙ МОЗАИКИ ОГУРЦА, Истомина Е.А., Коростылева Т.В., Конопкин А.А., Шиян А.Н., Пухальский В.А., Одинцова Т.И. ....	128
BIOLOGICAL CONTROL OF INFECTION CAUSED BY PATHOGENIC STRAINS OF CUCUMBER GREEN MOTTLE MOSAIC VIRUS IN CUCUMBER PLANTS, Istomina E.A., Korostyleva T.V., Konopkin A.A., Shiyani A.N., Pukhalskij V.A., Odintsova T.I. ....	130
3. БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА 5 СЕРОТИПА ПРИ ИНТЕРНАЗАЛЬНОМ И ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ, Ожаровская Т.А., Овчаренко Д.С., Артемова Э.А., Попова О., Картуесов А.Г., Зубкова О.В. ....	131
BIODISTRIBUTION OF A RECOMBINANT HUMAN ADENOVIRUS SEROTYPE 5 AFTER INTRANASAL AND INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION TO MICE, Ozharovskaia T.A., Ovcharenko D.S., Artemova E.A., Popova O., Kartuesov A.G., Zubkova O.V. ....	132
4. ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ ИЗ ПОЧВЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ СОКА ЛИМОНА, Синёва О.Н., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П. ....	133
THE ISOLATION OF ACTINOMYCETES – POTENTIAL PRODUCENTS OF ANTIBIOTICS FROM THE SOIL WITH THE ADDITION OF LEMON JUICE, Sineva O. N., Ivankova, T.D., Terekhova L. P. ....	134
5. ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК PSEUDOMONAS AERUGINOSA В УСЛОВИЯХ ТРОФИЧЕСКОГО И ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА, Коровенкова Н.В., Блинкова Л.П., Крылов В.Н., Пахомов Ю.Д., Плетенёва Е.А., Буркальцева М.В., Шабурова О.В. ....	135
THE DYNAMICS OF THE FORMATION OF NONCULTURABLE VIABLE CELLS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN CONDITIONS OF TROPIC AND OSMOTIC STRESS, Korovenkova N.V., Blinkova L.P., Krylov V.N., Pakhomov Yu.D., Pleteneva E.A., Burkalceva M.V., Shaburova O.V. ....	136
6. ДОСТИЖЕНИЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ОБЛАСТИ БИОБЕЗОПАСНОСТИ: БАКТЕРИИ, АНТИБИОТИКИ И ФАГИ, Яминский И.В. ....	137
ACHIEVEMENTS OF SCANNING PROBE MICROSCOPY IN THE FIELD OF BIOSAFETY: BACTERIA, ANTIBIOTICS AND PHAGS, Yaminsky I.V. ....	138
7. ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ВОДНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ, ПОРАЖАЮЩИХ БАКТЕРИИ РОДА PSEUDOMONAS, Алексюк М.С., Алексюк П.Г., Турмагамбетова А.С., Анаркулова Э.И., Молдаханов Е.С., Богоявленский А.П. ....	139
STUDY OF THE DIVERSITY OF WATER BACTERIOPHAGES INFECTING BACTERIA OF THE PSEUDOMONAS GENUS, Alexyuk M.S., Alexyuk P.G., Turmagambetova A.S., Anarkulova E.I., Moldakhanov E.S., Bogoyavlenskiy A.P. ....	140
8. ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ И РЕЗИСТОМА МИКРООРГАНИЗМОВ МОСКОВСКОГО МЕТРОПОЛИТЕНА, Почтовый А.А., Щетинин А.М., Гушчин В.А. ....	141
TAXONOMIC DIVERSITY ANALYSIS AND RESISTOME PROFILING OF MOSCOW SUBWAY SYSTEM MICROORGANISMS, Pochtovyy A.A., Shchetinin A.M., Gushchin V.A. ....	142
9. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНАЛОГОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ТАХИПЛЕЗИНА I, Маргрграф М.Б., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В. ....	143

STUDY ON THE CYTOTOXIC EFFECTS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE TACHYPLESIN I ANALOGS, Marggraf M.B., Kuzmin D.V., Panteleev P.V., Ovchinnikova T.V. ....	143
10. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ НЕЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ БИООБЪЕКТОВ, Найденова А.С., Колодязная В.А. ....	144
USING OF PRODUCTION ANIMAL-FREE MEDIUM IN CULTIVATION OF THE BIOOBJECTS, Naydenova A.S., Kolodyaznaya V.A. ....	146
11. ИНДИКАЦИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ, Амелькина А.А., Ремизов Е.К., Ларионова О.С., Древо Я.Б., Фауст Е.А. INDICATION OF ANTIMICROBIAL.....	147
PEPTIDES AND THE STUDY OF THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY, Amelkina A.A, Remizov E.K, Larionova O.S, Dereko Ya. B., Faust E.A. ....	148
12. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ РАСТВОРОВ ВЫМОРАЖИВАНИЕМ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПЕНИЦИЛЛИНАЗЫ, Фоменко И.А., Филимонова В.В., Савочкина И.В. ....	149
USING THE METHOD OF CONCENTRATION OF SOLUTIONS BY THE FREEZING IN THE TECHNOLOGY OF MANUFACTURE OF PENICILLINASE, Fomenko I.A., Filimonova V.V., Savochkina I.V. ....	150
13. ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОЛИН-БОГАТЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ КОЗЫ CAPRA HIRCUS, Калашников А.А., Пантелеев П.В., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. ....	151
STUDIES OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PROLINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF THE GOAT CAPRA HIRCUS, Kalashnikov A.A., Panteleev P.V., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. ....	151
14. МОЗАИЧНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА ЗИКА, Шаньшин Д.В., Казачинская Е.И., Бакулина А.Ю., Д.М. Гершони, Щербаков Д.Н. ....	152
MOSAIC BACTERIOPHAGES USAGE FOR ANTIBODIES AGAINST ZIKA VIRUS IDENTIFICATION, Shanshin D.V., Kazachinskaya E.I., Bakulina A.Yu., D.M. Gershoni, Shcherbakov D.N. ....	153
15. МОНИТОРИНГ УРОВНЯ АНТИБИОТИКОВ: ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПРЕССНЫХ МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ, Берлина А.Н., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. ....	155
MONITORING THE ANTIBIOTICS LEVEL: THE POSSIBILITIES OF RAPID MULTIPLEX TEST SYSTEMS, Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	155
16. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ МЕТОДОМ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА, А.А.Филиппова, М.Ю.Рубцова, И.П.Андреева, Г.В.Преснова, М.М.Уляшова, А.М.Егоров ....	156
DETERMINATION OF BETA-LACTAMASE GENES BY LATERAL FLOW HYBRIDIZATION ASSAY, A.Filippova, M.Rubtsova, I.Andreeva, G.Presnova, M.Ulyashova, A.Egorov ....	157
17. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА А-2В БЕЗ N-КОНЦЕВОГО МЕТИОНИНА, А.Ф.Елгина, Е.В.Демьянова, Е.С.Денисенко, В.И.Лисицкая, С.В.Мартюшин, Т.О.Антипова, А.Е.Полоцкий, Е.А.Протасов, Я.А.Забродская, И.Н.Горбунова, А.М.Ищенко ....	158
OPTIMIZATION OF MANUFACTURING TECHNOLOGY FOR PRODUCTION INTERFERON ALPHA-2B WITHOUT N-TERMINAL METHIONINE, A.Elgina, E. Demyanova, E.Denisenko, V.Lisitskaya, .Martyushin, T.Antipova, Polotsky, E.Protasov, Y.Zabrodsкая, .Gorbuнова, A.Ishchenko ....	159
18. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ, Михайлова Н.А., Солдатенкова А.В., Зими́на Е.М., Калиниченко Е.М., Калошин А.А. ....	160
EVALUATION OF THE SAFETY OF PSEUDOMONAS RECOMBINANT VACCINE, Michailova N.A., Soldatenkova A.V., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Kaloshin A.A. ....	161
19. ПОИСК СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТОВ ПАТОГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ, Шведас В. К., Суплатов Д. А., Нилов Д. К., Балдин С. М., Гущина И. В., Щербакова Т. А., Шмальгаузен Е. В. ....	161
SEARCH FOR SELECTIVE INHIBITORS OF PATHOGEN ENZYMES USING METHODS OF BIOINFORMATICS AND MOLECULAR MODELING, Švedas V. K., Suplatov D. A., Nilov D. K., Baldin S. M., Gushchina I. V., Shcherbakova T. A., Schmalhausen E. V. ....	162



20. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ II ФАЗЫ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ «ДНК-4», Акулова Е.Б., Мурашев Б.В., Веревошкин С.В., Машарский А.Э., Аль-Шехадат Р.И., Поддубный В.А., Зозуля О., Востокова Н.В., Козлов А.П. ....	164
PRELIMINARY RESULTS OF PHASE II CLINICAL TRIAL OF CANDIDATE HIV VACCINE "DNA-4", Akulova E.B., Murashev B.V., Verevchkin S.V., Masharsky A.E., Al-Shekhadat R.I., Poddubnyy V.A., Zozulya O.V., Vostokova N.V., Kozlov A.P. ....	165
21. РАЗРАБОТКА ВЫСОКОИММУНОГЕННОГО ПОЛИСАХАРИДНОГО КОНЪЮГИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ S. PNEUMONIAE СЕРОТИПА 9N, Р.Нуриев, И.Гальвидис, Н.Ястребова, М.Буркин .....	166
THE DEVELOPMENT OF HIGHLY IMMUNOGENIC POLYSACCHARIDE CONJUGATE FOR PROTECTION AGAINST S. PNEUMONIAE TYPE 9N, R.Nuriev, I.Galvidis, N.Yastrebova, M.Burkin .....	167
22. РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НА ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЯХ, Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Федорова Е.А., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С. ....	168
DEVELOPMENT OF CANDIDATE VACCINE AGAINST ROTAVIRUS INFECTION AND STUDYING ITS EFFECACY ON LABORATORY MODEL, Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Fedorova E.A., Dukhovlinov I.V., Simbirtsev A.S. ....	169
23. РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЁЗА И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НА ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЯХ, Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А. ....	170
THE DEVELOPMENT OF A CANDIDATE VACCINE AGAINST TUBERCULOSIS AND THE STUDY OF EFFECTIVENESS IN LABORATORY MODELS, Fedorova E. A., Bogomolova E. G., Dobrovolskaya O. A. ....	171
24. РАЗРАБОТКА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА СПЕЦИФИЧНОГО К БЕЛКУ P17 ВИЧ, Добровольская О.А., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Духовлинов И.В., Колмаков Н.Н., Луковенко А.А. ....	172
DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO P17 HIV-, Dobrovolskaya O.A., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Dukhovlinov I.V., Kolmakov N.N., Lukovenko A.A. ....	173
25. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОЙ БЕТА-ЛАКТАМНОЙ ПЛАТФОРМЫ, Панин Н.В., Дробот В.В., Никулин М.В., Тюрин Е.С., Швядас В.Ю.К. ....	174
ENZYMATIC SYNTHESIS OF UNIVERSAL BETA-LACTAM PLATFORM DEVELOPMENT, Panin N.V., Drobot V.V., Nikulin M.V., Tyurin E.S., Svedas V.Y.K. ....	175
26. РАСТИТЕЛЬНАЯ ПЛАТФОРМА ПРОДУКЦИИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, Е.В.Шешукова .....	176
PLANT PLATFORM OF PRODUCTION OF BISPECIFIC ANTIBODIES FOR TREATMENT OF BREAST CANCER, E.Sheshukova .....	177
27. СОЧЕТАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ГИБРИДНОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ ДЛЯ РАСШИРЕНИЯ СПЕКТРА ВЫЯВЛЯЕМЫХ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ, Буркин М.А., Нуриев Р.И., Гальвидис И.А., Еремин С.А. ....	178
MONOCLONAL ANTIBODIES COMBINING IN HYBRID ENZYME IMMUNOASSAY TO BROAD T HE SPECTRUM OF DETECTABLE SULFONAMIDES, Burkin M.A., Nuriev R.I., Galvidis I.A., Eremin S.A. ....	179
28. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЛЬФА-СПИРАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ ChMAP-28 И МЕЛИТТИНА, Емельянова А.А., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В. ....	180
COMPARATIVE STUDY OF THE CYTOTOXIC PROPERTIES OF ALPHA-HELICAL PEPTIDES ChMAP-28 AND MELITTIN, Emelianova A.A., Kuzmin D.V., Panteleev P.V., Ovchinnikova T.V. ....	181
29. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ, Овчинникова Т.В. ....	181
STRUCTURAL PECULARITIES, BIOLOGICAL FUNCTIONS AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES, Ovchinnikova T.V. ....	183
30. ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА BACILLUS SUBTILIS 20 КАК ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ШТАММОВ, П.Д.Осипова, Д.С.Карпов, А.И.Домашин, С.В.Киселева, Е.С.Челарская, М.И.Котлов, А.А.Гуридов .....	184
CHARACTERISATION OF THE BACILLUS SUBTILIS 20 STRAIN AS A PLATFORM FOR THE DEVELOPMENT OF NEW BIOTECHNOLOGICALLY IMPORTANT STRAINS, P.Osipova, D.Karpov, A.Domashin, S.Kiseleva, E.Chelarskaya, M.Kotlov, A.Guridov .....	185

31. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМПИЦИЛЛИНА В МОДЕЛЬНОЙ ГИДРОЭКОСИСТЕМЕ, Мащенко З.Е., Бахареv В.В., Маслова Е.В., Малышкин С.С., Платонов И.А., Павлова Л.В. ....	186
CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF AMPICILLIN IN THE MODEL HYDROSYSTEM, Mashchenko Z.E., Bakharev V.V., Maslova E.V., Malyshekin S.S., Platonov I.A., Pavlova L. V. ....	187
32. СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ LACTOBACILLUS HELVETICUS D75 И D76 И ВЫЯВЛЕНИЕ В ИХ СОСТАВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КЛАСТЕРОВ СИНТЕЗА БАКТЕРИОЦИНОВ, В.А.Торопов, Т.Я.Вахитов, О.Н.Шалаева, Е.К.Рощина .....	188
GENOME SEQUENCING OF PROBIOTIC BACTERIA LACTOBACILLUS HELVETICUS D75 AND D76 AND DETECTION IN THEIR COMPOSITION GENETIC CLUSTERS OF BACTERIOCIN SYNTHESIS, V.Toropov, T.Vakhitov, O.Schalaeva, E.Roschina .....	189
33. РОЛЬ З.В. ЕРМОЛЬЕВОЙ КАК ОСНОВОПОЛОЖНИКА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ, Л.П. Блинкова.....	190
THE ROLE OF Z.V. ERMOLEVA AS THE FOUNDER OF THE NATIONAL ANTIBACTERIAL DRUGS, L.P. Blinkova.....	191

УДК 577.112

## АМИЛОИДЫ БАКТЕРИЙ: БИОЛОГИЧЕСКИЕ РОЛИ И СВЯЗЬ С ПАТОГЕНЕЗОМ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Нижников А.А.<sup>1,2</sup>, Белоусов М.В.<sup>1,2</sup>, Антонец К.С.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Подбельского ш., 3, Пушкин, Санкт-Петербург, 196608, Россия.

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия.  
e-mail: ant.nizhnikov@gmail.com

Амилоиды представляют собой белковые фибриллы с особой структурой, которые не только вызывают десятки неизлечимых болезней, но и выполняют ряд жизненно-важных функций у прокариот и эукариот. Последние исследования показывают, что амилоиды бактерий являются факторами вирулентности и могут участвовать в патогенезе инфекционных заболеваний человека.

**Ключевые слова:** амилоид, фибрилла, фактор вирулентности, бактерия, Escherichia coli, YghJ, OmpA, OmpC, CsgA

Способность некоторых белков формировать амилоиды, то есть фибриллы с особой упорядоченной пространственной структурой, играет важную роль в патогенезе десятков неизлечимых болезней человека и животных, включающих, например, нейродегенеративные заболевания, различные системные и локализованные амилоидозы и, возможно, некоторые виды рака. Такие патологические амилоиды обычно возникают в результате мутаций, меняющих структуру или уровень продукции соответствующих белков. В отличие от патологических, функциональные амилоиды образуются в норме и выполняют определенные биологические функции у прокариот и эукариот, включая человека. Наибольшего разнообразия функциональные амилоиды достигают у бактерий, у которых в последнее время идентифицировано около 10 групп белков, образующих функциональные амилоиды, участвующие, в том числе, в формировании биопленок, запасании токсинов и преодолении поверхностного натяжения воды. Полученные в последнее время данные показывают, что среди амилоидных белков бактерий значительную долю составляют факторы вирулентности, то есть те белки, за счет которых бактерии колонизируют многоклеточных хозяев. Например, амилоидными свойствами обладает целый ряд факторов вирулентности бактерии Escherichia coli: курлин CsgA, порины наружной мембраны OmpA и OmpC, муциновая металлопротеаза YghJ. Так, белок YghJ, играющий важную роль в вирулентности энтеротоксигенных штаммов Escherichia coli, образует амилоидоподобные агрегаты in vivo и без сверхпродукции, а его металлопротеазный домен формирует фибриллы, обладающие всеми ключевыми свойствами амилоидов [1]. Можно предположить, что формирование амилоидной структуры факторами вирулентности позволяет им сохранять стабильность и активность в агрессивной внутренней среде организма-хозяина. Выявление путей ингибирования амилоидогенеза факторов вирулентности бактерий в будущем может предоставить возможность разработки инновационных подходов эффективной терапии бактериальных инфекций.

Работа выполнена при поддержке грантов Президента Российской Федерации (МК-3240.2017.4 и МК-512.2017.4) и РФФИ (16-34-60153).

Литература:

1. Belousov M.V., Bondarev S.A., Kosolapova A.O., Antonets K.S., Sulatskaya A.I., Sulatsky M.I., Zhouravleva G.A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Nizhnikov A.A. M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils // *PLOS One*. 2018. Vol. 13(1). e0191317.

УДК 577.112

## AMYLOIDS OF BACTERIA: BIOLOGICAL ROLES AND CONNECTION WITH THE PATHOGENESIS OF HUMAN AND ANIMAL INFECTIOUS DISEASES

Nizhnikov A.A.<sup>1,2</sup>, Belousov M.V.<sup>1,2</sup>, Antonets K.C.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology, Podbelskogo sh., 3, Pushkin, St. Petersburg, 196608, Russia.

<sup>2</sup> St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia.  
e-mail: ant.nizhnikov@gmail.com

Amyloids are protein fibrils with a special structure that not only cause dozens of incurable diseases but are also involved in various vital functions in prokaryotes and eukaryotes. Recent studies show that amyloids of bacteria are virulence factors and can participate in the pathogenesis of human infectious diseases.

**Key words:** amyloid, fibril, virulence factor, bacterium, *Escherichia coli*, YghJ, OmpA, OmpC, CsgA

The ability of some proteins to form amyloid fibrils, i.e. fibrils with a highly ordered spatial structure, plays an important role in the pathogenesis of dozens of incurable diseases of humans and animals including, for example, neurodegenerative diseases, various systemic and localized amyloidoses and, possibly, certain cancers. Such pathological amyloids usually result from mutations that alter the structure or level of production of the corresponding proteins. Unlike pathological, functional amyloids are formed in the native conditions and perform certain biological functions in prokaryotes and eukaryotes, including humans. The greatest diversity of functional amyloids occurs in bacteria, in which about 10 groups of proteins that form functional amyloids have been identified. These amyloids participate in the formation of biofilms, storage of toxins and overcoming of water surface tension. Recent data show that significant fraction of bacterial amyloid proteins is presented by virulence factors, i.e. proteins through which bacteria colonize multicellular hosts. Thus, a number of virulence factors of *Escherichia coli* possess amyloid properties including the CsgA curlin, the OmpA and OmpC porins of the outer membrane, as well as the YghJ mucin metalloprotease. For example, the YghJ protein playing an important role in the virulence of the enterotoxigenic strains of *E. coli*, forms amyloid-like aggregates *in vivo* and without overproduction, while its metalloprotease domain forms fibrils possessing the key properties of amyloids [1]. It can be assumed that the formation of the amyloid structure by virulence factors allows them to maintain stability and activity in the aggressive internal environment of the host organism. The study of possible ways for inhibition of the amyloidogenesis of bacterial virulence factors could provide a key to developing innovative approaches for effective therapy of bacterial infections in future.

This work was supported by the Grants of the President of the Russian Federation (МК-3240.2017.4 and МК-512.2017.4) and Russian Foundation for Basic Research (16-34-60153).

References:

1. Belousov M.V., Bondarev S.A., Kosolapova A.O., Antonets K.S., Sulatskaya A.I., Sulatsky M.I., Zhouravleva G.A., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Nizhnikov A.A. M60-like metalloprotease domain of the *Escherichia coli* YghJ protein forms amyloid fibrils // *PLOS One*. 2018. Vol. 13(1). e0191317.

УДК 578.24: 578.865

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ ОГУРЦА ОТ ПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ЗЕЛеной КРАПЧАТОЙ МОЗАИКИ ОГУРЦА

Истомина Е.А., Коростылева Т.В., Конопкин А.А., Шиян А.Н., Пухальский В.А., Одинцова Т.И.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук  
119991, ГСП – 1 Москва, ул. Губкина, д.3  
e-mail: mer06@yandex.ru

Вакцинация – биологический способ защиты растений от вирусных инфекций. Показана высокая эффективность использования аттенуированного штамма ВИРОГ-43М для защиты растений огурца от патогенных штаммов вируса.

**Ключевые слова:** ВЗКМО, вакцинация, аттенуированный штамм.

Самое распространенное вирусное заболевание огурцов, поражающих растения в защищенном грунте, вызывается вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО). ВЗКМО относится к роду тобамовирусов и поражает растения семейства Cucurbitaceae. В зависимости от степени поражения растений огурца, потери урожая могут составить до 45%, при этом снижается товарный вид и качество плодов. Для защиты растений от инфекции используются химические средства защиты, селекция на устойчивость и севооборот. Альтернативным способом защиты растений от вирусных инфекций является вакцинация – обработка растений аттенуированными штаммами вируса [1], которые способны вызывать устойчивость к родственным патогенным штаммам этого же вируса, используя естественный механизм защиты растений от вирусной инфекции, называемый вирус – индуцированным умолканием генов [2].

Аттенуированный штамм ВИРОГ-43М (патент РФ № 2320721, 27. 03.2008) был предложен для вакцинации растений огурца от патогенных штаммов ВЗКМО [3]. Цель работы – проверка эффективности штамма ВИРОГ-43М для защиты растений огурца, выращенных в теплицах в двух разных регионах РФ – в Приволжье и Краснодарском крае. Производственные испытания проводили с декабря 2016 по сентябрь 2017 года на разных гибридах F1 огурца (Кураж и Мева) в разные календарные периоды. Площадь вакцинированных, т.е. обработанных аттенуированным штаммом ВИРОГ-43М, и невакцинированных посадок составляла 1 га. Оценивали число растений с симптомами мозаики через 1, 2 и 3 месяца после обработки ВИРОГ-43М. Полученные результаты представлены в Таблице 1.

Название гибрида F1 , <u>округ РФ</u> и район испытаний	Время посадки рассады	Варианты испытаний,	Число растений с симптомами мозаики , %		
			1 месяц	2 месяц	3 месяц
Мева, F1 <u>Южный регион</u> Краснодар	Декабрь 2016	Вирог-43М	0	0,5	1,3
		Контроль	1	11,0	22,0
	Май 2017	Вирог-43М	0	3,3	5,5
		Контроль	5,0	15,0	35,0
Кураж, F1 <u>Приволжский федеральный округ</u> Ульяновск	Январь 2017	Вирог-43М	0	0,5	1,2
		Контроль	2,0	7,5	16,0
	Июль 2017	Вирог-43М	0,1	2,2	4,4
		Контроль	2,1	12,4	25,0

Таблица 1. Оценка эффективности предобработки растений огурца аттенуированным штаммом ВИРОГ-43М.

Установлено, что через 3 месяца после обработки растений огурца аттенуированным штаммом ВИРОГ-43М, количество растений с мозаичными симптомами уменьшалось минимум в 10 раз в зимние периоды и в 5 раз в весенние периоды.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16 -16 -00032.

*Литература:*

1. Сухов К.С., Подъяпольская Т.С., Извекова Л.И. Иммунизация растений против патогенного действия вирусов. М.: Наука, 1979.
2. Voinnet, O., Pinto Y.M., and Baulcombe D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1999. - V. 96. - P. 14147 - 14152.
3. Slavokhotova A. A., Istomina E. A., Andreeva E. N., Korostyleva T. V., Pukhalskij V. A., Shijan A. N., Odintsova T. I. An Attenuated Strain of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus as a Biological Control Agent against Pathogenic Viral Strains // American Journal of Plant Sciences. - 2016. - V. 7. - P. 724 - 732.

UDK 578.24: 578.865

## BIOLOGICAL CONTROL OF INFECTION CAUSED BY PATHOGENIC STRAINS OF CUCUMBER GREEN MOTTLE MOSAIC VIRUS IN CUCUMBER PLANTS

Istomina E.A., Korostyleva T.V., Konopkin A.A., Shiyan A.N., Pukhalskij V.A., Odintsova T.I.

Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
 119333, Moscow, Gubkina str. 3  
 e-mail: mer06@yandex.ru

Vaccination is a biological control measure to cope with viral infection. The high efficiency of VIROG - 43M for protection of cucumber plants from pathogenic viral strains was demonstrated.

**Key words:** CGMMV, vaccination, attenuated strain

The most common viral disease affecting cucumber plants in greenhouses is caused by cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV). CGMMV belongs to tobamoviruses and infects plants of the Cucurbitaceae family. Depending on the degree of infection, yield losses can amount to 45%, the performance and quality of fruits is also dramatically affected. To protect plants from infection, chemical agents are used in combination with breeding for resistance and crop rotation. An alternative strategy consists in vaccination, treatment of plants with attenuated viral strains [1], which is based on the natural defense mechanisms of plants against viruses called virus - induced gene silencing [2].

The attenuated CGMMV strain VIROG-43M was suggested as a biological control agent to protect cucumber plants against pathogenic viral strains (patent of Russian Federation № 2320721, 27. 03.2008) [3]. The goal of this work was to evaluate the efficiency of the VIROG-43M strain in protecting cucumber plants grown in greenhouses in two region of Russian Federation – Povolzhie and Krasnodar. Industrial trials were conducted from December 2016 to September 2017 using two F1 cucumber hybrids (Kurazh and Meva) during winter and summer vegetation periods. The area of vaccinated treated with VIROG - 43M and control plantings was 1 hectare. The number of plants with symptoms 1, 2, and 3 months after vaccination was determined. The results obtained are presented in the Table 1.

F1 hybrid <i>Region of Russian Federation</i> Town of trials	Time of seedling planting (vegetation period)	Experimental variant	Number of plants with mosaic symptoms, %		
			1 month	2 month	3 month
Meva, F1 <i>Southern region,</i> Krasnodar	December 2016	VIROG-43M	0	0,5	1,3
		Control	1	11,0	22,0
	May 2017	VIROG-43M	0	3,3	5,5
		Control	5,0	15,0	35,0
Kurazh, F1 <i>Privolzhie region,</i> Ul'yanovsk	January 2017	VIROG-43M	0	0,5	1,2
		Control	2,0	7,5	16,0
	July 2017	VIROG-43M	0,1	2,2	4,4
		Control	2,1	12,4	25,0

Table 1 The efficiency of cucumber plant pretreatment with VIROG-43M strain for protection against pathogenic viral strains under greenhouse conditions

It was shown that three months after vaccination with the VIROG-43M strain the number of plants with mosaic symptoms decreased at least 10-fold during the winter vegetation period and 5-fold during the spring season.

The work was supported by Russian Science Foundation (grant no. 16 - 16 -00032).

References:

1. Sukhov K.S., Pod'yapol'skaya T.S., Izvekova L.I. Immunization of plants against the pathogenic effect of viruses. M. Nauka, 1979.
2. Voinnet, O., Pinto Y.M., and Baulcombe D. C. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA

and RNA viruses of plants // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1999. - V. 96. - P. 14147 -14152.

3. Slavokhotova A.A., Istomina E.A., Andreeva E.N., Korostyleva T.V., Pukhalskij V.A., Shijan A.N., Odintsova T.I. An Attenuated Strain of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus as a Biological Control Agent against Pathogenic Viral Strains // American Journal of Plant Sciences. - 2016. - V. 7. - P. 724 -732.

УДК 606

## БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОВИРУСА ЧЕЛОВЕКА 5 СЕРОТИПА ПРИ ИНТЕРНАЗАЛЬНОМ И ВНУТРИМЫШЕЧНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ

Ожаровская Т.А., Овчаренко Д.С., Артемова Э.А., Попова О., Картуесов А.Г., Зубкова О.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия  
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18. e-mail: o.tatiana09@yahoo.com

Исследовано биораспределение рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа (Ад5) в различных органах и тканях мышей методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Произведено сравнение биораспределения после двух методов введения аденовируса: интерназального и внутримышечного.

**Ключевые слова:** аденовирус, биораспределение, ПЦР-РВ.

В настоящее время при разработке эффективных генетических вакцин особое внимание уделяют аденовирусным векторам как средствам доставки целевых генов в клетки. Среди генетических вакцин, проходящих клинические испытания, на долю препаратов на основе рекомбинантных аденовирусных векторов приходится наибольшее количество исследований - 20,5% [1]. Однако, прежде чем вакцина переходит на этап клинических исследований, на этапе доклинических исследований происходит оценка безопасности и эффективности лекарственного средства, в том числе оценка биораспределения изучаемого препарата.

Было исследовано биораспределение рекомбинантного Ад5 по органам и тканям при интерназальном и внутримышечном способах введения препарата в количестве  $4 \times 10^8$  БОЕ на мышшь (линии BALB/c). Контрольным группам мышшь вводили фосфатный буфер. Через 6 часов после введения препарата мышшь были эвтаназированы, после чего были отобраны пробы (20 мг) органов и тканей: печень, почки, легкие, мышшь, селезенка, тонкий кишечник, толстый кишечник, ткани носовой полости, верхние и нижние лимфоузлы тела, сердце, мозг, а также кровь (0,5 мл). Далее из проб выделяли тотальную ДНК, чистоту и концентрацию которой определяли спектрофотометрически. Все полученные препараты содержали достаточное для анализа методом ПЦР-РВ количество ДНК без примесей белка. Результаты эксперимента представлены на рисунках 1 и 2.

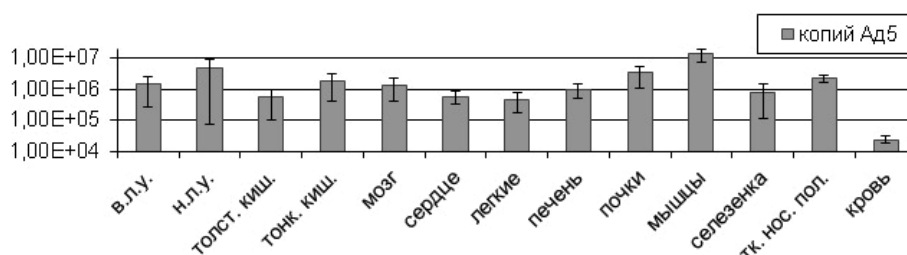


Рисунок 1. Количественный анализ геномов Ад5 в органах и тканях после однократной внутримышечной инъекции.

Наибольшее количество геномов на 100 нг тотальной ДНК рекомбинантного Ад5 при внутримышечном введении было детектировано в мышцах  $(1,34 \pm 0,59) \times 10^7$  копий Ад5 и нижних лимфатических узлах  $(4,75 \pm 0,02) \times 10^6$  копий Ад5.

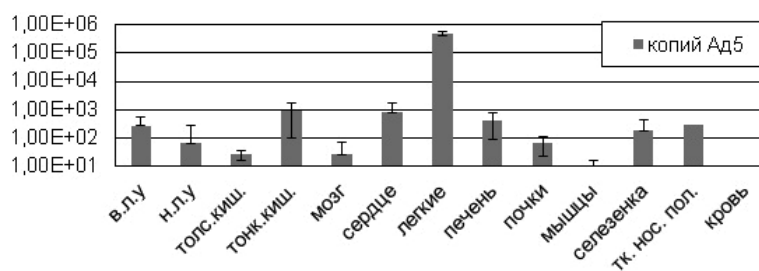


Рисунок 2. Количественный анализ геномов Ад5 в органах и тканях после однократной интерназальной иммунизации.

При интерназальной иммунизации наибольшее количество геномов Ад5 было обнаружено в легких ( $5,08 \pm 0,91 \times 10^5$ ) и сердце ( $1,13 \pm 0,91 \times 10^3$ ).

Таким образом, после введения препарата на основе Ад5, аденовирус незначительно циркулирует по органам, а в основном сосредотачивается в местах введения: при внутримышечной иммунизации – в мышцах, а при интерназальной иммунизации – в легких, поступая туда из носовой полости.

Литература:

1. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide // The Journal of Gene Medicine.*  
<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php> (дата обращения: 13.04.2018)

UDC 606

## BIODISTRIBUTION OF A RECOMBINANT HUMAN ADENOVIRUS SEROTYPE 5 AFTER INTRANASAL AND INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION TO MICE

Ozharovskaia T.A., Ovcharenko D.S., Artemova E.A., Popova O., Kartuesov A.G., Zubkova O.V.

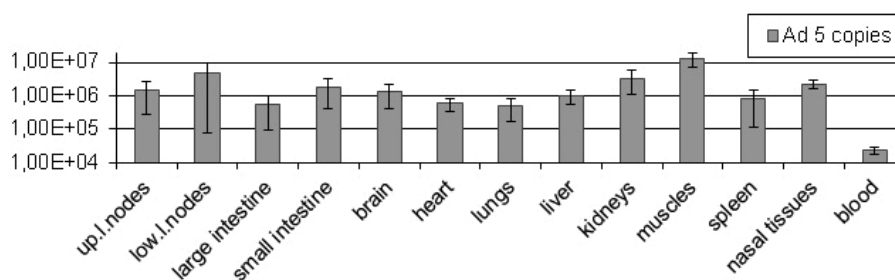
N. F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia  
123098, Moscow, Gamaleya Str., 18. e-mail: o.tatiana09@yahoo.com

The biodistribution of a recombinant human adenovirus serotype 5 (Ad5) in different organs and tissues was investigated using the quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The results of the biodistribution were compared after two routes of administration: intranasal and intramuscular.

**Key words:** adenovirus, biodistribution, qPCR.

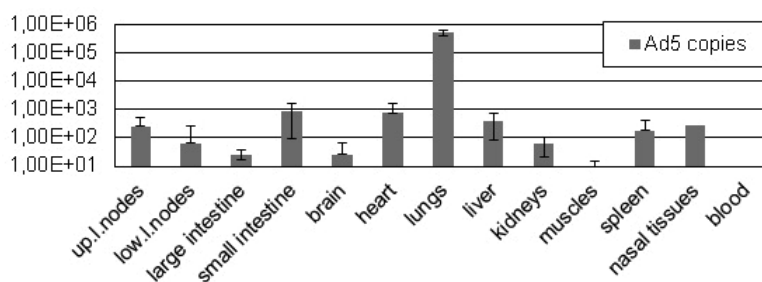
Today while designing effective gene vaccines much attention is paid to the adenoviral vectors as delivery vehicles for target genes to cells. Among the genetic vaccines involved in clinical trials the recombinant adenoviral vector based vaccines have the priority with 20,5% of all trials [1]. However, before the clinical trials of a certain vaccine during the preclinical trials safety and efficiency of the drug is evaluated, including the evaluation of the biodistribution.

The biodistribution of the recombinant Ad5 (in an amount of  $4 \times 10^8$  PFU for a BALB/c line mouse) in organs and tissues after intranasal and intramuscular administration was investigated. Phosphate buffer was administrated to control groups of mice. 6 hours after the administration the mice were euthanized. Then samples (20 mg) were collected of the next organs and tissues: liver, kidneys, lungs, muscles, spleen, small intestine, large intestine, nasal tissues, upper and lower lymph nodes, heart, brain, and blood (0.5 ml). The total DNA was isolated from the samples and the purity and the concentration of DNA was identified by a spectrophotometer. All the DNA samples contained the relevant amount for the qPCR analysis without protein impurities. The results of the experiment are shown in pictures 1 and 2.



Picture 1. The quantitative analysis of Ad5 genomes in organs and tissues after single-entry intramuscular administration.

The biggest amount of recombinant Ad5 genomes in 100 ng of the total DNA after intramuscular administration was detected in muscles -  $(1,34 \pm 0,59) \times 10^7$  copies of Ad5 and lower lymph nodes -  $(4,75 \pm 0,02) \times 10^6$  copies of Ad5.



Picture 2. The quantitative analysis of Ad5 genomes in organs and tissues after single-entry intranasal administration.

After intranasal immunization the biggest amount of genomes was detected in lungs  $(5,08 \pm 0,91) \times 10^5$  and heart  $(1,13 \pm 0,91) \times 10^3$ .

To sum up, after administration of a medicine based on Ad5, the adenovirus slightly circulates on organs. Ad5 mostly assembles in injection sites: after intramuscular administration it is mostly found in muscles and after intranasal administration – in lungs, where it comes from the nasal cavity.

#### References:

1. *Gene Therapy Clinical Trials Worldwide // The Journal of Gene Medicine.*  
<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php> (date of the application: 13.04.2018)

## ВЫДЕЛЕНИЕ АКТИНОМИЦЕТОВ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ ИЗ ПОЧВЫ С ДОБАВЛЕНИЕМ СОКА ЛИМОНА

Синёва О.Н., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»  
119021, Москва, ул. Большая Пироговская, дом 11, строение 1  
[Olga.sineva81@yandex.ru](mailto:Olga.sineva81@yandex.ru)

Проведено исследование влияния сока лимона на выделение актиномицетов из почвы. Выделено из почвенного образца 82 культуры актиномицетов. Изучена антибиотическая активность выделенных культур актиномицетов.

**Ключевые слова:** актиномицеты, методы, выделение, сок лимона

Известно, что актиномицеты являются продуцентами биологически активных соединений, среди которых выделены вещества, обладающие антибактериальным, антигрибковым, противоопухолевым действием, и соединения, подавляющие развитие возбудителей паразитарных заболеваний. В процессе по-



иска продуцентов биологически активных соединений и для экологических исследований применяются методы селективной изоляции актиномицетов, которые основаны на различиях в питательных потребностях, физиологических свойствах, спектрах чувствительности к антибиотикам и другим ингибиторам роста у разных групп микроорганизмов.

Сок лимона (*Citrus limon*) содержит большое количество органических кислот (лимонная, яблочная), пектиновые вещества, сахара, каротин, фитонциды; витамины – тиамин, рибофлавин, аскорбиновая кислота, рутин, флавоноиды, производные кумарина, галактуроновую кислоту, сесквитерпены, гесперидин, эриоцитрин, эридиктиол и др.

В наших исследованиях сок лимона был добавлен в почвенную суспензию в концентрациях 30% и 50%, полученные суспензии настаивались в течение 30 минут. Высев почвенных суспензий производился на органический агар Гаузе №2. Проведенные исследования показали, что добавление сока лимона в концентрации 30% приводит к увеличению количества выросших колоний актиномицетов на 5% по сравнению с контролем. Добавление сока лимона в концентрации 50% привело к снижению количества колоний на чашках Петри на 25% по сравнению с контролем. Оценка биоразнообразия выделенных культур показала, что при добавлении 30% сока лимона наблюдается небольшое снижение количества быстрорастущих актиномицетов рода *Streptomyces*, при этом количество культур редких родов актиномицетов возрастает на 8%. При добавлении 50% сока лимона в суспензию, количество культур редких родов увеличивается на 15% по сравнению с контролем. Таким образом, для выделения культур редких родов актиномицетов - потенциальных продуцентов новых антибиотически активных соединений, целесообразно применять более высокую концентрацию сока лимона. Было отмечено, что количество грибных колоний и колоний немиецелиальных бактерий на чашках Петри существенно снижается в варианте с 30% соком лимона. Полностью отсутствовал рост данных микроорганизмов в варианте с 50% соком лимона, что позволило выделить большее количество медленно растущих колоний редких родов актиномицетов. Всего было выделено в чистую культуру 82 штамма актиномицетов. Выделенные культуры были проверены на антибиотическую активность в отношении тест микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042. Результаты показали, что 23 штамма активны в отношении Гр+ тест-организмов, 1 штамм в отношении Гр - тест-организмов, 2 штамма актиномицетов проявляли активность в отношении *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042.

## THE ISOLATION OF ACTINOMYCETES – POTENTIAL PRODUCENTS OF ANTIBIOTICS FROM THE SOIL WITH THE ADDITION OF LEMON JUICE

Sineva O. N., Ivankova, T.D., Terekhova L. P.

*Gause Institute of New Antibiotics  
119021, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya St, house 11, building 1  
Olga.sineva81@yandex.ru*

The study of the influence of lemon juice on the isolation of actinomycetes from the soil was carried out. From the soil sample was isolated 82 cultures of actinomycetes. Antibiotic activity of selected cultures of actinomycetes was studied.

Keywords: actinomycetes, methods, selection, lemon juice

It is known that actinomycetes are producers of biologically active compounds, among which are substances that have antibacterial, antifungal, antitumor effect, and compounds that inhibit the development of pathogens of parasitic diseases. In the process of searching for producers of biologically active compounds and for environmental studies, methods of selective isolation of actinomycetes are used, which are based on differences in nutritional needs, physiological properties, spectra of sensitivity to antibiotics and other growth inhibitors in different groups of microorganisms.

Lemon juice (*Citrus limon*) contains a large number of organic acids (citric, malic), pectin substances, sugars, carotene, phytoncides; vitamins – thiamine, riboflavin, ascorbic acid, flavonoids, coumarin derivatives, galacturonic acid, sesquiterpenes, hesperidin, eriocitrin, eridiktiol, etc.

In our studies, lemon juice was added to the soil suspension at concentrations 30% and 50%, the resulting suspensions were infused for 30 minutes. The seeding of soil suspensions was carried out on organic agar Gauze

№2. Studies have shown that the addition of lemon juice at concentration 30% leads to the increase in the number of grown actinomycetes colonies by 5% compared with the control. The addition of lemon juice in concentration 50% led to a decrease in the number of colonies on Petri dishes by 25% compared to control. The assessment of biodiversity of the selected cultures showed that when adding 30% lemon juice there was a slight decrease in the number of fast-growing actinomycetes of the genus *Streptomyces*, while the number of rare genera of actinomycetes cultures increased by 8%, with the addition 50% lemon juice in the suspension, the number of rare genera cultures increased by 15% compared to control. Thus, higher concentrations of lemon juice is advisable to use for the isolation of cultures of rare genera actinomycetes - potential producers of new antibiotic active compounds. It was noted that the number of fungal colonies and colonies of non-micellar bacteria on Petri dishes was significantly reduced in the variant with 30% lemon juice and was completely absent in the variant with 50% lemon juice, which allowed to allocate a greater number of slow-growing colonies of the rare genera of actinomycetes. A total of 82 strains of actinomycetes were isolated into pure culture. The isolated cultures have been tested for antibiotic activity against test micro-organisms: *Staphylococcus aureus* ИНА 00985 (FDA 209P), *Staphylococcus aureus* ИНА 00761 (MRSA), *Staphylococcus aureus* ИНА 00762, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042. The results showed that 23 strains were active against Gr + test organisms, 1 strain was active against Gr- test organisms, 2 strains of actinomycetes were active against *Saccharomyces cerevisiae* ИНА 01042.

УДК 616:579.61

## ДИНАМИКА ФОРМИРОВАНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В УСЛОВИЯХ ТРОФИЧЕСКОГО И ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Коровенкова Н.В., Блинкова Л.П., Крылов В.Н., Пахомов Ю.Д., Плетенёва Е.А., Буркальцева М.В., Шабурова О.В.

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия  
105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а  
e-mail: b.larus@mail.ru

Формирование некультивируемых клеток у фагочувствительных и фагоустойчивых *P. aeruginosa* при осмотическом и трофическом стрессе

**Ключевые слова:** жизнеспособные; некультивируемые; фагоустойчивые; фагочувствительные; псевдомонады

**Введение.** Существующие в природе фагочувствительные и фагоустойчивые псевдомонады, вероятно, могут на разном уровне сохранять свою жизнеспособность и осуществлять переход в некультивируемое состояние. Некультивируемое состояние (НС) характеризуется образованием в популяции беспоровых микроорганизмов жизнеспособных некультивируемых клеток (ЖНК), не растущих на питательных средах. В условиях, благоприятных для роста и развития клеток или при воздействии на них индуцирующих факторов, наблюдается обратный переход бактерий к физиологически активному состоянию. Реверсия к культивируемости может фенотипически выражаться в колебаниях численности колониеобразующих единиц (КОЕ/мл).

Целью настоящей работы являлось сравнение в динамике уровня образования жизнеспособных некультивируемых клеток у фагочувствительной и фагоустойчивой культур *P. aeruginosa* в условиях длительного стресса.

**Материалы и методы.** В экспериментах использовали нелизогенный (фагочувствительный) штамм *Pseudomonas aeruginosa* PAO (ph<sup>-</sup>), его лизогенизированный фагом G101 субштамм *P. aeruginosa* PAO (ph<sup>+</sup>). Стрессовыми факторами (трофическим и осмотическим) являлась искусственная морская вода с повышенным содержанием NaCl (дополненная до 4 и 5% NaCl). Во флаконы с этой безбелковой средой вносили 24-часовой посевной инокулят, отмытый физраствором концентрат указанных культур, которые были выращены на питательном бульоне при 37°C. Инкубацию флаконов проводили в течение 116 суток при 20-22°C с периодическим отбором образцов.

Среднее значение КОЕ/мл для культур во флаконах составляло  $3,65 \pm 0,25 \times 10^7$ . Этот показатель использовали для оценки жизнеспособности псевдомонад. Тотальное количество бактерий определяли в камере Горяева-Тома и по оптической плотности популяции. Оптическую плотность бактериальных су-

спензий определяли с помощью спектрофотометра КФК-3-01. Долю живых и мертвых клеток оценивали после их дифференциального окрашивания красителем Live/Dead® в люминесцентном микроскопе Opton с увеличением 320. Количество жизнеспособных некультивируемых клеток определяли, сопоставляя эти показатели.

**Результаты и обсуждение.** Наблюдения за основными характеристиками популяций в условиях длительного стресса показали, что при содержании в морской воде 4 или 5 % NaCl в фагочувствительных клетках псевдомонад, не несущих в геноме профага (ph-), по сравнению с (ph+) появлялось более значительное количество ЖНК. Так, для концентрации 4 и 5% NaCl к 116 суткам обнаружены ЖНК, соответственно, 74% против 55% и 52% против 42%. Кроме того, для 4% NaCl к 48 суткам выявлено 95% ЖНК для (ph-) и 35% ЖНК для (ph+). Для морской воды с 5% NaCl аналогичная количественная тенденция к преимущественному формированию ЖНК в (ph-) популяции отмечена к 48 сут. (65% против 40%) и к 69 суткам (75% против 43%). Зафиксированные колебания всех показателей популяции могли быть связаны с литическим распадом клеток. После этого продукты распада псевдомонад могли являться дополнительным питательным субстратом и индуцировать подъем количества КОЕ/мл вследствие реверсии клеток из НС в вегетативное состояние.

**Закключение.** В условиях трофического и осмотического стресса при длительной инкубации более высокое содержание ЖНК в популяции фагочувствительных клеток *P. aeruginosa*, не содержащих профага, возможно, является проявлением защитной функции для сохранения фагочувствительных бактерий от возможного литического воздействия циркулирующих в окружающей среде фагов и от других неблагоприятных факторов.

UDK 616:579.61

## THE DYNAMICS OF THE FORMATION OF NONCULTURABLE VIABLE CELLS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN CONDITIONS OF TROPHIC AND OSMOTIC STRESS

Korovenkova N.V., Blinkova L.P., Krylov V.N., Pakhomov Yu.D., Pleteneva E.A., Burkalceva M.V., Shaburova O.V.

*I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia  
 105064, Moscow, Maliy Kazenniy pereulok, 5a  
 e-mail: b.larus@mail.ru*

The formation of unculturable cells among phage-sensitive and phage-resistant *P. aeruginosa* under osmotic and trophic stress

Keywords: viable; nonculturable; phage-resistant; phage-sensitive; *Pseudomonas aeruginosa*

Phage-sensitive and phage-resistant *Pseudomonas* spp. that exist in nature may probably maintain their viability at different levels and shift to nonculturable state. Viable but nonculturable (VBNC) state is characterized by formation of cells in a population of nonsporeforming bacteria that do not grow on nutrient media. In conditions favorable for growth and development or after exposure to inducing factors, reversion to physiologically active state is observed. Reversion can be phenotypically expressed as variation in numbers of colony forming units (CFU/ml).

Aim of this study was to compare the dynamics of formation of VBNC cells in phage-sensitive and phage-resistant cultures of *P. aeruginosa* in long-term stress conditions.

**Materials and methods.** Non-lysogenic (phage-sensitive) strain of *Pseudomonas aeruginosa* PAO (ph-) and its substrain PAO(ph+) lysogenized with G101 phage were used in the experiment. Artificial seawater with increased NaCl concentration (NaCl was added to final concentrations of 4 and 5%). Flasks with this protein-free medium were inoculated with concentrated cells grown for 24 hours in nutrient broth at 37°C and washed with normal saline. Flasks were incubated for 116 days at 20-22°C. Samples were taken periodically.

Average CFU/ml value for inoculated flasks was  $3,65 \pm 0,25 \times 10^7$ . This parameter was used to assess viability of *P. aeruginosa*. Total cell counts were performed in Goryaev-Toma counting chamber and by optical density. Optical density was measured using KFK-3-01 spectrophotometer. Portion of viable cells was determined after staining with Live/Dead® double staining kit under OPTON luminescent microscope at x320 magnification. Numbers of viable cells was determined by comparing these values.

**Results and discussion.** Observations of main characteristics of populations under prolonged stress conditions showed, that at concentrations of NaCl in seawater at 4 or 5% in phage-sensitive cells that do not carry a prophage in their genome (ph-) compared to (ph+) more significant numbers of VBNC cells appeared. Thus, at 4 and 5%

of NaCl by 116-th day VBNC cells were observed at 74 to 55% and 52 to 42% respectively. Moreover for 4% of NaCl by 48 days 95% of VBNC cells were observed for (ph-) and 35% for (ph+). For seawater with 5% NaCl similar quantitative tendency to primary VBNC formation in (ph-) population was recorded by 48 (65% to 40%) and 69 days (75% to 43%). Observed variation of population characteristics could be attributed to lytic decay of cells. After that decay products of *P. aeruginosa* could be used as added nutrient substrate and induce increase in CFU/ml values as a consequence of resuscitation of VBNC cells into vegetative state.

Conclusion. In conditions of trophic and osmotic stress during prolonged incubation a higher content of VBNC cells in the population phage-sensitive of *P. aeruginosa* that does not contain prophage, perhaps, is a manifestation of the protective function to preserve phage-sensitive bacteria from possible lytic influence of phages, circulating in the environment and from other adverse factors.

УДК 579.61

## ДОСТИЖЕНИЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ОБЛАСТИ БИОБЕЗОПАСНОСТИ: БАКТЕРИИ, АНТИБИОТИКИ И ФАГИ

Яминский И.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия  
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 1  
e-mail: yaminsky@genebee.msu.ru  
Центр перспективных технологий, Москва, Россия  
119311, Москва, ул. Строителей, 4-5-47  
e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

Приведен обзор последних достижений в области сканирующей зондовой микроскопии – визуализации бактерий, фагов и их взаимодействия. Представлено оригинальное решение по созданию пьезокерамических кантилеверных биочипов для раннего обнаружения бактериальных клеток в жидких средах.

**Ключевые слова:** биосенсоры, биочипы, антибиотикорезистентность, сенсорные поверхности, пьезокерамика

Сканирующая зондовая микроскопия позволяет получить детальное изображение бактериальных клеток на твердой подложке с нанометровым пространственным разрешением. В одной из первых работ по этой теме было обнаружено различие в морфологии липополисахаридов наружной мембраны исходной бактерии *Escherichia coli* и её трансдуктантного штамма, унаследовавшего *rfa*-3,4 ген *Shigella flexneri*, возбудителя дизентерии [1].

Благодаря уникальным возможностям и эффективности зондовой микроскопии получено большое число изображений различных бактерий, что позволяет создать наглядный атлас и соответственно дополнить новой информацией энциклопедическое издание – Определитель бактерий Берджи [2].

В 2013 году было предложено определять устойчивость бактерии к антибиотикам за счет измерения спектра её механических колебаний, определяемого с помощью кантилеверного сенсора [3]. Нами предложено оригинальное решение биосенсора на основе пьезокерамического биочипа для обнаружения бактериальных клеток в жидкости с последующим определением их устойчивости к конкретному антибиотику [4]. Отличительные характеристики – высокая чувствительность (на уровне обнаружения отдельных клеток), низкая стоимость устройства, биочипа и одного измерения. Избирательность биочипа достигается за счет применения аффинных поверхностей на основе сенсорных слоев с высокой биоспецифичностью. Использование проточной ячейки существенно повышает вероятность обнаружения бактерий при их исходной концентрации в растворе [5]. В работе [6] было предложено дополнительно определять бактерии, регистрируя их отрыв от подложки при постепенном увеличении амплитуды колебаний подложки. С помощью аналогичного метода проводилось обнаружение и бактериофагов [7].

Сканирующая зондовая микроскопия обладает определенным преимуществом перед другими микроскопическими методами – возможностью наблюдения за процессами в живой природе в естественном окружении. В случае бактерий можно наблюдать за ростом бактерий, образованием биопленок и пр. В работе [8] осуществлена визуализация взаимодействия бактериофагов с поверхностью бактериальных клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 17-52-560001).

## Литература:

1. Яминский И.В., Демин В.В., Бондаренко В.М. Различия в клеточной поверхности гибридных бактерий *Escherichia coli* K12, наследующих *rfb-a3,4* ген *Shigella flexneri*, выявляемые с помощью атомно-силовой микроскопии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – № 6. – С. 15–18.
2. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. & Whitman, W.B. (eds., 2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 3, Springer-Verlag, New York, NY
3. Longo, G.; Alonso-Sarduy, L.; Rio, L. Marques; Bizzini, A.; Trampuz, A.; Notz, J.; Dietler, G.; Kasas, S. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors // *Nature Nanotechn.* 2013. Vol. 8. Issue 7. P. 522-526.
4. Назаров И.А., Ахметова А.И., Яминский И.В., Мешков Г.Б., Сагитова А.В. Биосенсорное устройство для обнаружения биологических микро- и нанообъектов // Патент России № 2636048, 17.11.2017.
5. Соснин В.С., Ахметова А.И., Яминский И.В., Яминский Д.И., Мешков Г.Б., Оленин А.В. Проточная жидкостная ячейка для сканирующей зондовой микроскопии // Патент России № 2638365, 13.12.2017.
6. M.A.Cooper, F.N.Dultsev, V.Ostanin, D.Klenerman. Separation and detection of bacteria using rupture event scanning // *Analytica chimica acta* 2011. Vol 702(2). P. 233-238.
7. F.N.Dultsev, R.Speight, M.T. Fiorini, J.M. Blackburn, Ch. Abell, V.Ostanin, D.Klenerman. Direct and Quantitative Detection of Bacteriophage by "Hearing" Surface Detachment Using a Quartz Crystal Microbalance // *Analytical Chemistry* 2001. Vol.73(16). P. 3935-3939.
8. E.V. Dubrovin, A.G. Voloshin, S.V. Kraevsky, T.E. Ignatyuk, S.S. Abramchuk, I.V. Yaminsky, and S.G. Ignatov. Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria. // *Langmuir*, 24, (2008), 13068-13074.

UDC 579.61

## ACHIEVEMENTS OF SCANNING PROBE MICROSCOPY IN THE FIELD OF BIOSAFETY: BACTERIA, ANTIBIOTICS AND PHAGS

Yaminsky I.V.

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

1-1, Leninskie Gory, 119991, Moscow

e-mail: yaminsky@genebee.msu.ru

*Advanced Technologies Center, Moscow, Russia*

4-5-47, Stroiteley str., 119311, Moscow

e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru

The review of the latest achievements in the field of scanning probe microscopy – the visualization of bacteria, phages and their interaction is reviewed. An original solution for creating piezoceramic cantilever biochips for early detection of bacterial cells in liquid media is presented.

**Key words:** biosensors, biochips, antibiotic resistance, sensory surfaces, piezoceramics

Scanning probe microscopy makes it possible to obtain a detailed image of bacterial cells on a solid substrate with a nanometer spatial resolution. In one of the first papers on this topic, a difference in the morphology of the lipopolysaccharides of the outer membrane of the original bacterium *Escherichia coli* and its transductant strain, which inherited *rfb-a 3,4* gene of *Shigella flexneri*, a causative agent of dysentery [1], was found.

Thanks to the unique capabilities and efficiency of scanning probe microscopy, a large number of images of various bacteria have been obtained, which makes it possible to create a visual atlas and, accordingly, to supplement the encyclopedic edition – *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – with the new information [2].

In 2013, it was suggested to determine the resistance of bacteria to antibiotics by measuring the spectrum of its mechanical oscillations, determined with the help of a cantilever sensor [3]. We propose an original solution of a biosensor based on a piezoceramic biochip for detecting bacterial cells in a liquid and then determining their resistance to a specific antibiotic [4]. Distinctive characteristics - high sensitivity (at the level of detection of individual cells), low cost of the device, biochip and one measurement. The selectivity of the biochip is achieved through the use of affinity surfaces based on sensory layers with high biospecificity. The use of a flow cell significantly increases the probability of detection of bacteria at low concentrations in solution [5]. It was proposed in [6] to further determine the bacteria by detecting their detachment from the substrate using a gradual increase in the amplitude of the substrate oscillations. A similar method was used to detect bacteriophages [7].

Scanning probe microscopy has a certain advantage over other microscopic methods – the ability to observe life processes in a natural environment. In the case of bacteria, one can observe the growth of bacteria, the formation of biofilms, etc. In paper [8] the interaction of bacteriophages with the surface of bacterial cells was visualized.

The reported study was funded by RFBR according to the research project №17-52-560001.

#### References

1. Yaminsky I.V., Demin V.V., Bondarenko V.V. The differences in cellular surface of hybrid bacteria *Escherichia coli* K12, inheriting *rfa-a3,4* gene of *Shigella flexneri* as revealed by atomic force microscopy // *J. microbiology, epidemiology, and immunology*. 1997. N. 6. P. 15–18.
2. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. & Whitman, W.B. (eds., 2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Vol. 3, Springer-Verlag, New York, NY
3. Longo, G.; Alonso-Sarduy, L.; Rio, L. Marques; Bizzini, A.; Trampuz, A.; Notz, J.; Dietler, G.; Kasas, S. Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors // *Nature Nanotechn.* 2013. Vol. 8. Issue 7. P. 522-526.
4. Nazarov I.A., Akhmetova A.I., Yaminsky I.V., Meshkov G.B., Sagitova A.V. Biosensor device for the detection of biological micro- and nanoobjects // Patent RF N 2636048, 17.11.2017.
5. Sosnin V.S., Akhmetova, Yaminsky I.V., Yaminsky I.V., Meshkov G.B., Olenin A.V. Flowing liquid cell for scanning probe microscopy // Patent RF N 2638365, 13.12.2017.
6. M.A.Cooper, F.N.Dultsev, V.Ostanin, D.Klenerman. Separation and detection of bacteria using rupture event scanning // *Analytica chimica acta* 2011. Vol 702(2). P. 233-238.
7. F.N.Dultsev, R.Speight, M.T. Fiorini, J.M. Blackburn, Ch. Abell, V.Ostanin, D.Klenerman. Direct and Quantitative Detection of Bacteriophage by "Hearing" Surface Detachment Using a Quartz Crystal Microbalance // *Analytical Chemistry* 2001. Vol.73(16). P. 3935-3939.
8. E.V. Dubrovin, A.G. Voloshin, S.V. Kraevsky, T.E. Ignatyuk, S.S. Abramchuk, I.V. Yaminsky, and S.G. Ignatov. Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria. // *Langmuir*, 24, (2008), 13068-13074.

УДК 574.57.04

## ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ ВОДНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ, ПОРАЖАЮЩИХ БАКТЕРИИ РОДА PSEUDOMONAS

**Алексюк М.С., Алексюк П.Г., Турмагамбетова А.С., Анаркулова Э.И., Молдаханов Е.С., Богоявленский А.П.**

РГП «Институт микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан  
050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103.  
Email: Madina.a06@gmail.com

Методом секвенирования нового поколения в водных образцах, собранных из озера, расположенного вблизи городской больницы города Капчагай, Казахстан были обнаружены последовательности бактериофагов, поражающих бактерии рода *Pseudomonas*.

**Ключевые слова:** бактериофаги, антибиотикоустойчивость, *Pseudomonas aeruginosa*, секвенирование.

Использовать бактериофаги в качестве противомикробных агентов впервые было предложено Феликсом Д'Эреллем, в 1917 году [1]. Однако, после открытия антибиотиков, интерес к фаговой терапии резко снизился. Антибиотики представляли собой дешёвое в производстве и чрезвычайно эффективное средство против болезнетворных бактерий. А вследствие того, что антибиотики не причиняют значительного вреда организму человека при их употреблении, они стали идеальным решением для борьбы с бактериальными инфекциями. Но в результате массового, бесконтрольного использования антибиотиков, на сегодняшний день значительно увеличилось количество бактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью, и несмотря на интенсивную работу фармацевтических компаний, за последние 30 лет не было найдено новых, высокоэффективных классов антибиотиков [2]. В результате чего, вновь резко возрос интерес к возможностям терапевтического использования бактериофагов для борьбы с антибиотикоустойчивыми бактериальными инфекциями [3].

Целью настоящих исследований являлось изучение разнообразия бактериофагов, способных лизировать *Pseudomonas aeruginosa* – вида бактерий, вызывающих массовые, антибиотикоустойчивые внутрибольничные инфекции.

Разнообразие бактериофагов специфичных для рода *Pseudomonas* определяли методом метагеномного секвенирования водных образцов, собранных из озера, расположенного вблизи городской больницы города Капчагай, Казахстан (43°50'25,2" N, 77°03'08,5" E). Вирусосодержащий материал из водного образца концентрировали методом ультрацентрифугирования при 100000g. Из сконцентрированной вирусной суспензии выделяли нуклеиновую кислоту, на её основе подготавливали библиотеки для секвенирования. Структуру нуклеотидных последовательностей определяли методом множественного параллельного

секвенирования на приборе HiSeq 2000 «Illumina». В результате биоинформатической обработки данных секвенирования было установлено, что около 13% от числа обнаруженных вирусных последовательностей отряда Caudovirales, принадлежат бактериофагам, поражающих бактерии рода *Pseudomonas*. Данные бактериофаги являются представителями дцДНК вирусов семейств Myoviridae, Siphoviridae и Podoviridae. Также были обнаружены последовательности безхвостых фагов *Pseudomonas* семейства Inoviridae. Предположительно, среди обнаруженных последовательностей присутствуют бактериофаги способные лизировать мукоидные и не мукоидные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, поэтому могут являться основой для создания терапевтических средств против нозокомиальных инфекций и штаммов бактерий, формирующих биопленки.

*Литература:*

1. d'Herelle F. *On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli* // *Comptes Rendus Academie des Sciences*. – 1917. – Vol. 5. – P. 165 - 373.
2. Zaman S.B., Hussain M.A., Nye R., Mehta V., Mamun K.T., Hossain N. A. *Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing*. Muacevic A., Adler J.R., eds. // *Cureus*. – 2017. – Vol. 9(6):e1403. - doi:10.7759/cureus.1403.
3. Lin D.M., Koskella B., Lin H.C. *Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance* // *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. - 2017. – Vol. 8(3). – P.162-173. doi:10.4292/wjgpt.v8.i3.162.

UDC 574.57.04

## STUDY OF THE DIVERSITY OF WATER BACTERIOPHAGES INFECTING BACTERIA OF THE PSEUDOMONAS GENUS

Alexyuk M.S., Alexyuk P.G., Turmagambetova A.S., Anarkulova E.I., Moldakhanov E.S., Bogoyavlenskiy A.P.  
 RSE "Institute of Microbiology and Virology", Almaty, Kazakhstan  
 050010, Almaty, Bogenbai batyr str, 103.  
 Email: Madina.a06@gmail.com

By the method of new generation sequencing of water samples collected from a lake located near the hospital of the Kapchagai city, Kazakhstan, sequences of bacteriophages, infecting bacteria of the *Pseudomonas* genus were detected.

**Key words:** bacteriophages, antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, sequencing.

The use of bacteriophages as antimicrobial agents was first proposed by Felix d'Herelle, in 1917 [1]. However, after the discovery of antibiotics, interest in phage therapy fell sharply. Antibiotics were cheap in production and extremely effective against pathogens. And due to the fact that antibiotics do not cause significant damage to the human body during their use, they have become an ideal solution for fighting bacterial infections. But as a result of the massive, uncontrolled use of antibiotics, the number of bacterial infections with multiple drug resistance has increased significantly today, and despite the intensive work of pharmaceutical companies, no new, highly effective classes of antibiotics have been found in the last 30 years [2]. As a result, interest in the possibilities of therapeutic use of bacteriophages for fighting with antibiotic-resistant bacterial infections has again sharply increased [3].

The purpose of the present research was study the diversity of bacteriophages capable to lyse of *Pseudomonas aeruginosa*, a species of bacteria that cause massive, antibiotic-resistant nosocomial infections.

A variety of bacteriophages specific for the genus *Pseudomonas* was determined by the method of metagenomic sequencing of water samples collected from a lake located near the hospital of the Kapchagai city, Kazakhstan (43 ° 50'25.2 "N, 77 ° 03'08.5" E). The virus-containing material from the aqueous sample was concentrated by ultracentrifugation at 100,000 g. Nucleic acid was isolated from the concentrated virus suspension, libraries for sequencing were prepared on its basis. The structure of the nucleotide sequences was determined by the method of multiple parallel sequencing on the HiSeq 2000, "Illumina".

As a result of bioinformatic processing of sequencing data, it was found that about 13% of the number of detected virus sequences of the order Caudovirales belong to bacteriophages that infect bacteria of the *Pseudomonas* genus. These bacteriophages are representatives of the dsDNA viruses of the Myoviridae, Siphoviridae and Podoviridae families. Sequences of filamentous *Pseudomonas* phages of the Inoviridae family were also detected. Presumably, among the detected sequences there are bacteriophages capable of lysing mucoid and non-mucoid strains of the *Pseudomonas aeruginosa*, and therefore can be the basis for the development of therapeutic agents against nosocomial infections and bacterial strains that form biofilms.

References:

1. d'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli // *Comptes Rendus Academie des Sciences*. – 1917. – Vol. 5. – P. 165 - 373.
2. Zaman S.B., Hussain M.A., Nye R., Mehta V., Mamun K.T., Hossain N. A. Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. Muacevic A., Adler J.R., eds. // *Cureus*. – 2017. –Vol. 9(6):e1403. - doi:10.7759/cureus.1403.
3. Lin D.M., Koskella B., Lin H.C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance // *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. - 2017. –Vol. 8(3). – P.162-173. doi:10.4292/wjgpt.v8.i3.162.

УДК 579.25

## ИЗУЧЕНИЕ РАЗНООБРАЗИЯ И РЕЗИСТОМА МИКРООРГАНИЗМОВ МОСКОВСКОГО МЕТРОПОЛИТЕНА

Почтовый А.А.<sup>1,2</sup>, Щетинин А.М.<sup>1</sup>, Гущин В.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория трансляционной биомедицины, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия 119234, Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр. 12.  
e-mail: a.pochtovyy@gmail.com

Было проведено изучение микробиологического разнообразия станций Новокосино и Черкизовская Московского метрополитена. Проведенный анализ позволил определить резистом и таксономический профиль микроорганизмов характерных для данных станций.

**Ключевые слова:** метагеномика, метрополитен, резистом, NGS.

Присутствующие в окружающей среде микроорганизмы все чаще признаются неотъемлемым компонентом человеческого здоровья и факторами возникновения эпидемий [1], [2]. Изучение разнообразия микроорганизмов и оценка генов антибиотикорезистентности особенно важно в местах с высокой плотностью населения, таких как города, где в настоящее время проживает большая часть населения мира (54%) [3].

Московский метрополитен входит в первую десятку метрополитенов мира по пассажиропотоку (более 2,3 млрд человек в год [4]). Эта экосистема требует постоянного мониторинга и защиты от биотерроризма и вспышек заболеваний.

Для изучения антибиотикорезистентности микроорганизмов в аэрозоле воздуха были выбраны две станции Московского метрополитена, отличающиеся прежде всего по пассажиропотоку – станция метро «Новокосино» (76 тыс. пассажиров в сутки) и «Черкизовская» (24 тыс. человек в сутки). Сбор аэрозоля был осуществлен с помощью виртуального импактора SASS 4000 и циклонного коллектора SASS 2300 (SASS, Research International Inc., США). Таргетная амплификация 16S рPHK была осуществлена с помощью Ion 16S™ Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific, США) с дальнейшим секвенированием ампликонов на секвенаторе Ion S5XL (Thermo Fisher Scientific, США). Для изучения антибиотикорезистентности аэрозольной микрофлоры собранных образцов был применен прямой метод оценки с высевом собранных образцов на селективные среды содержащие основные антибиотики, входящие в перечень ЖНВЛП. Образцы, проявившие антибиотикорезистентность, были идентифицированы с помощью MALDI Biotyper (Bruker, США).

В результате проведенной работы было изучено микробиологическое разнообразие двух станций Московского метрополитена. Сравнительный анализ позволил определить профиль общих и характерных для каждой станции микроорганизмов. Был проведен количественный и качественный анализ изменения микроорганизмов в зависимости от загруженности станций. Микробиологический посев аэрозольной пробы на среду с антибиотиками с дальнейшим типированием устойчивых микроорганизмов позволил определить резистом исследуемых станций.

Literatura:

1. Peterson J. et al. The NIH human microbiome project // *Genome research*. 2009. Vol.19. №.12. P.2317-2323.
2. Nicholas A.B. et al. Metagenomic analysis of the airborne environment in urban spaces // *Microbial ecology*. 2015. Vol.69. №.2. P.346-355.
3. *World Urbanization Prospects: The 2014 Revision, Highlights*. Department of Economic and Social Affairs // *United Nations New York*. 2014. P.2.
4. Официальный веб-сайт Московского метрополитена. URL: <http://gup.mosmetro.ru/o-metropolitene/> (дата обращения 01.03.2018)



UDC 579.25

## TAXONOMIC DIVERSITY ANALYSIS AND RESISTOME PROFILING OF MOSCOW SUBWAY SYSTEM MICROORGANISMS

Pochtovyy A.A.<sup>1,2</sup>, Shchetinin A.M.<sup>1</sup>, Gushchin V.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Translational Biomedicine Laboratory, N.F.Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

119234, Moscow, Leninskie Gory, 1-12

e-mail: a.pochtovyy@gmail.com

0

Diversity study of microorganisms inhabiting air and surfaces of Moscow subway stations (Novokosino and Cherkizovskaya) has been conducted. Taxonomic and resistome profiles specific for each examined station have been uncovered.

**Key words:** Metagenomics, Subway, resistome, NGS.

Surrounding us microorganisms are increasingly considered as major components of human health and epidemiological factors [1], [2]. Studies on bacterial diversity and their antibiotic resistance genes are particularly important in places with high population densities, such as cities, where the majority of world's population lives (54%) [3].

Moscow subway is ranked in top 10 subway systems in the world by the passenger traffic numbers (more than 2.3 billion people per year) [4]. This ecosystem requires constant monitoring and protection from bioterrorism attacks and pathogen outbreaks.

Two subway stations ranging by passenger traffic numbers – Novokosino (76 thousand people per day) and Cherkizovskaya (24 thousand people per day) - were chosen to characterize taxonomic and antibiotic resistance profiles of air-living microorganisms in Moscow subway system. Aerosol from these stations was collected using virtual impactor SASS 4000 and cyclone collector SASS 2300 (SASS, Research International Inc., USA). 16S rRNA gene regions were amplified and converted into DNA libraries with Ion 16S™ Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and were further sequenced on Ion S5XL machine (Thermo Fisher Scientific, USA). In order to examine antibiotic resistance of aerosol-living microorganisms collected samples were cultured on mediums with main antibiotics included in the List of Vital Essential and Necessary Drugs. Samples with observed resistance were identified using MALDI Biotyper (Bruker, USA).

As a result of conducted study microbiological diversity of two Moscow subway stations was characterized. Comparative analysis allowed us to determine profiles of shared and unique bacteria and archaea among the stations. Additionally, qualitative and quantitative analyses of taxonomic profile changes due to passenger traffic were performed. Culturing approach followed by MALDI typing allowed us to characterize resistome profiles of sampled subway stations.

### References:

1. Peterson J. et al. The NIH human microbiome project //Genome research. 2009. Vol.19. №.12. P.2317-2323.
2. Nicholas A.B. et al. Metagenomic analysis of the airborne environment in urban spaces //Microbial ecology. 2015. Vol.69. №.2. P.346-355.
3. World Urbanization Prospects: The 2014 Revision, Highlights. Department of Economic and Social Affairs //United Nations New York. 2014. P.2.
4. Official website of the Moscow Subway. URL: <http://gup.mosmetro.ru/o-metropolitene/> (accessed on 01.03.2018)

УДК 577.29, 577.181.5

## ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНАЛОГОВ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ТАХИПЛЕЗИНА I

Маргграф М.Б., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академик  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
e-mail: thpcb92@mail.ru

На панели опухолевых и нормальных клеточных линий человека изучены цитотоксические свойства ана-  
логов катионного  $\beta$ -шпилечного антимикробного пептида тахиплезина I.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды; катионные  $\beta$ -шпилечные пептиды; цитотоксический эффект;  
противоопухолевая активность.

Тахиплезин I –  $\beta$ -шпилечный антимикробный пептид (АМП), выделенный из гемоцитов мечехвоста  
*Tachypleus tridentatus*. Ранее при исследовании цитотоксических свойств рекомбинантных аналогов трех  
катионных  $\beta$ -шпилечных АМП – асеницина-1, гомезина и тахиплезина I – мы показали, что тахиплезин I  
обладает наибольшей цитотоксичностью в отношении ряда опухолевых клеточных линий человека.

С целью создания эффективных аналогов тахиплезина I с низкой гемолитической активностью была  
проведена замена гидрофобных аминокислотных остатков Val6 и Tyr8 в структуре пептида на остатки Ser  
или Arg. Таким образом, были получены аналоги V6R, V6S, Y8R и Y8S.

На панели опухолевых и нормальных клеточных линий человека с помощью МТТ-теста была измерена  
величина цитотоксического эффекта.

В случаях, когда процентное соотношение выживших клеток составляло  $\leq 50\%$ , были рассчитаны зна-  
чения IC50 для полученных аналогов тахиплезина I.

Установлено, что по сравнению с тахиплезином I его аналоги либо не оказывают выраженного цито-  
токсического эффекта на опухолевые и нормальные клеточные линии, либо проявляют сопоставимую  
цитотоксическую активность по отношению к опухолевым и нормальным клеткам в одних и тех же кон-  
центрациях. Наиболее эффективным аналогом тахиплезина I из вышеуказанных является аналог Y8R. Для  
данного аналога значения IC50 на опухолевых линиях SKBR-3 и HeLa составили 72 мкМ и 85 мкМ, соот-  
ветственно. Значения IC50 для тахиплезина I на SKBR-3 и HeLa были в несколько раз меньше – 53 мкМ  
и 15 мкМ, соответственно. Значения IC50 для аналога Y8R на нормальных клеточных линиях HEF и NHA  
составили 96 мкМ и 85 мкМ, а для тахиплезина I – 33 мкМ и 26 мкМ, соответственно.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

UDC 577.29, 577.181.5

## STUDY ON THE CYTOTOXIC EFFECTS OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE TACHYPLESIN I ANALOGS

Marggraf M.B., Kuzmin D.V., Panteleev P.V., Ovchinnikova T.V.

M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia  
117997, Moscow, Miklukho-Maklaya Street, 16/10  
e-mail: thpcb92@mail.ru

On different cancer and normal cell lines the cytotoxic effects of  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptide tachyple-  
sin I analogs was assayed.

**Key words:** antimicrobial peptides; cationic  $\beta$ -hairpin peptides; cytotoxic effect; anticancer activity.

Tachypleusin I is a  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptide isolated from hemocytes of the horseshoe crab *Tachypleus*  
*tridentatus*. Recently we reported that among three investigated  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptides – arenicin-1,  
gomesin and tachypleusin I – tachypleusin I was the most cytotoxic towards cancer human cells.

Substitution of hydrophobic aminoacid residues Val6 and Tyr8 by Ser or Arg residues in the peptide structure was  
made to develop the effective tachypleusin I analogs with low hemolytic activity. Thus analogs V6R, V6S, Y8R and

Y8S were produced.

Cytotoxicity assessment of tachyplesin I analogs was carried out on cancer and normal human cell lines using MTT-test. The IC<sub>50</sub> values were determined if the percentage of living cells was  $\leq 50\%$ .

The obtained data indicated that tachyplesin I analogs in contrast to tachyplesin I either displayed not significant cytotoxic effect against cancer and normal cells or displayed comparable cytotoxic activity towards cancer and normal cells in the same concentrations.

Among the investigated peptides Y8R is the most effective tachyplesin I analog. IC<sub>50</sub> values of Y8R for SKBR-3 and HeLa cells equaled 72  $\mu\text{M}$  and 85  $\mu\text{M}$ , respectively. IC<sub>50</sub> values of tachyplesin I for SKBR-3 and HeLa cells were several times lower – 53  $\mu\text{M}$  and 15  $\mu\text{M}$ , respectively. IC<sub>50</sub> values of Y8R for normal cells HEF and NHA equaled 96  $\mu\text{M}$  and 85  $\mu\text{M}$ , and IC<sub>50</sub> values of tachyplesin I – 33  $\mu\text{M}$  and 26  $\mu\text{M}$ , respectively.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 14-50-00131).

УДК 576.852+615.332

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ НЕЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ БИООБЪЕКТОВ

Найденова А.С., Колодяжная В.А.

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия,  
 Санкт-Петербург, Российская Федерация  
 197376, Санкт-Петербург, улица Профессора Попова, д. 14, литера А.  
 e-mail: anastasiya.naydenova@pharminnotech.com

Питательные среды, содержащие компоненты животного происхождения часто применяются при ферментации рекомбинантных штаммов-продуцентов *E.coli*. В работе предлагается замена таких компонентов на альтернативное сырье неживотного происхождения с последующей оптимизацией их концентрации и условий культивирования, используя Design of Experiments (DoE).

**Ключевые слова:** питательные среды, компоненты неживотного происхождения, оптимизация биотехнологических процессов, design of experiments (DoE).

*Escherichia coli* является одним из наиболее предпочитаемых бактериальных продуцентов рекомбинантных белков терапевтического назначения, обладающим существенными преимуществами. Во-первых, *E.coli* обеспечивает быстрый рост на относительно дешевых средах, содержащих пептоны, дрожжевой экстракт, а также на минеральных средах. Во-вторых, *E.coli* является объектом, достаточно изученным генетиками, у которого можно варьировать стратегию экспрессии продукта в зависимости от его свойств и целей исследователей (накопление в периплазматическом пространстве, в цитоплазме в виде телец-включений или использование внеклеточного пути). В-третьих, существует возможность получения культур высокой плотности, что обеспечивает высокий выход целевого продукта [2].

Питательные среды (ПС), содержащие компоненты животного происхождения (например, пептоны) часто используются в процессе ферментации штаммов-продуцентов *E.coli* при получении рекомбинантных белков. Пептоны обладают высокой питательной ценностью для микроорганизмов, однако нестандартность таких компонентов оказывает влияние на рост продуцента и биосинтез целевого продукта. Следующим отрицательным фактором использования в ПС компонентов животного происхождения является риск передачи возбудителя губчатой энцефалопатии животных и латентных вирусов через лекарственные препараты для медицинского применения [1]. Уменьшение данного риска, требуемое GMP, достигается при использовании сырья неживотного происхождения, как более рациональный вариант. Таким образом, современные тенденции в биотехнологии включают переход к применению ПС, содержащих стандартное сырье неживотного происхождения. В экспериментальной части работы планируется оптимизировать технологию ферментации рекомбинантного штамма-продуцента *E.coli*, используя альтернативные компоненты неживотного происхождения. Оптимизацию биотехнологических процессов проводят при помощи методики design of experiments (DoE) [3], сочетающей эффективность и минимальное количество проводимых экспериментов.

На первом этапе осуществляется скрининг переменных (концентрации компонентов ПС, условия процесса, время индукции и др.), которые влияют на выход целевого продукта. Например, благодаря Plackett-Burman design (PBD) в случае ферментации достаточно исследовать влияние 9-11 переменных [4,

5], соответственно подходящий размер матрицы – 12´11 (рис. 1,А). Каждая переменная имеет свой рассматриваемый диапазон, где крайние точки – низкий (-1) и высокий уровень (+1). Результаты, полученные в ходе проведения экспериментов, указанных в матрице PBD, анализируют с помощью статистических программ (MiniTab, Modde, Design-Expert) [3]. Определяют коэффициент детерминации, F-критерий, р-уровень значимости (р). Переменные, соответствующие значению  $p < 0,1$ , являются наиболее влиятельными факторами, обычно, 3-4 фактора исследуются на втором этапе. Далее эти переменные нуждаются в дальнейшей оптимизации для получения максимального выхода целевого продукта. На этом этапе эксперименты планируют с использованием Central Composite Design (CCD, рис. 1,В) в виде Central Composite Face centered Design (CCF) или Central Composite Circumscribed Design (CCC) [3]. Результаты экспериментов анализируются в статистических программах, проводится дисперсионный анализ, определяется положительное или отрицательное влияние переменных и их взаимодействия. Уравнением описывается упрощенная модель, строятся поверхности отклика и контурные графики, где пики являются оптимальными областями факторов. Таким образом, математическая модель прогнозирует оптимальное значение факторов, экспериментальная проверка предсказанных значений параметров завершает оптимизацию.

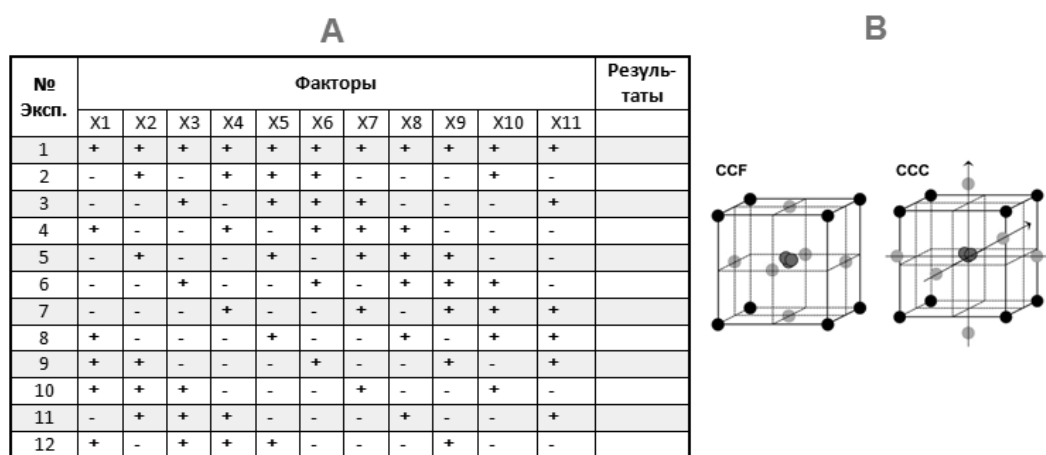


Figure 1. A) Matrix Plackett-Burman design (PBD) for screening variables. B) Two forms of Central Composite Design.

Рисунок 1. А) Матрица Plackett-Burman design (PBD) для скрининга переменных. В) Два типа Central Composite Design.

*Литература:*

1. Об утверждении Правил надлежащей производственной практики: [приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 (ред. от 18.12.2015)] [Электронный ресурс] // Минпромторг России. – Режим доступа: <http://качество.рф/documents/order> (дата обращения: 10.12.2017).
2. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives / M. N. Baeshen [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 25(7). – P. 953–962.
3. Bioprocess Optimization Using Design-of-Experiments Methodology / C.-F. Mandenius [et al.] // *Biotechnol. Prog.* – 2008. – Vol. 24(6). – P. 1191-1203.
4. Periplasmic expression optimization of VEGFR2 D3 adopting response surface methodology: Antiangiogenic activity study / W.Cao [et al.] // *Protein Expression and Purification.* – 2013. – Vol. 90. – P. 55–66.
5. Expression and Secretion of Endostar Protein by *Escherichia Coli*: Optimization of Culture Conditions Using the Response Surface Methodology / A. Mohajeri [et al.] // *Mol. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 58(10). – P. 634-647.

UDC 576.852+615.332

## USING OF PRODUCTION ANIMAL-FREE MEDIUM IN CULTIVATION OF THE BIOOBJECTS

**Naydenova A.S., Kolodyaznaya V.A.**

*Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy, Russian Federation  
 14A, Prof. Popov St., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation  
 e-mail: anastasiya.naydenova@pharminnotech.com*

The production mediums containing animal derived components are frequently applied in the fermentation of recombinant strain-producers E.coli. The replacement of these components by alternative animal-free source and following optimization of component concentrations and cultivation conditions with using of methodology Design of Experiments (DoE) are offered in this work.

**Key words:** production medium, animal-free components, optimization of biotechnological processes, design of experiments (DoE).

Escherichia coli is one of most preferred bacterial producers of recombinant therapeutical proteins which has significant advantages. Firstly, E.coli provides rapid growth on the relatively cheap production medium containing peptones, yeast extract and on mineral medium. Secondly, E.coli is well understood by genetics object, the expression strategy of E.coli can be varied depending on the protein properties and purposes of the investigators (periplasmic space accumulation, as inclusion bodies into cytoplasm or extracellular secretion). Thirdly, the reaching of high cell densities is possible that provides high yield of target protein [2].

The production mediums (PM) containing animal derived components, f.e. peptones, are often used in the fermentation processes of strain-producers E.coli to obtain the recombinant proteins. Peptones have high feed value for microorganisms; however these components are non-standard and influence the growth of the producer and biosynthesis of target protein. The next negative factor of using of the animal derived nutrients is the risk of transmission of animal spongiform encephalopathy agents and latent viruses via human medicinal products [1]. Decrease in this risk required by GMP is reached by using animal-free source as most rational version. So the current trends in biotechnology include conversion to using PM containing standard animal-free source. It's planned to optimize fermentation technology of recombinant strain-producers E.coli with using alternative animal-free source in experimental part of the work. The optimization of biotechnological processes is conducted applying methodology design of experiments (DoE) [3] that combine efficiency and minimal quantity of the conducted experiments.

The screening of the variables influenced the protein yield (concentration of PM components, process conditions, induction time and other) is realized at the first stage. For example, it's sufficient to investigate the influence 9-11 variables [4, 5] by Plackett-Burman design (PBD), so the suitable size of matrix is 12<sup>1</sup>11 (fig. 1,A). Each variable has its considered range, the extreme values are low (-1) and high level (+1). The results obtained in the course of experiences from matrix PBD are analyzed by statistical software (MiniTab, Modde, Design-Expert) [3]. Coefficient of determination, F-value, P-value (p) are determined. The variables corresponding value p<0.1 are most influential factors; usually 3-4 factors are studied at the second stage. Further it's necessary to optimize these variables for obtaining the maximal yield of the target product. The experiences of the second stage are planned using Central Composite Design (CCD, fig. 1, B) in the form Central Composite Face centered Design (CCF) or Central Composite Circumscribed Design (CCC) [3]. The results of experiences are analyzed by statistical software, analysis of variance is performed, the positive and negative effects of variables and interactive effects between variables are determined. A simplified model is described by equation; the response surface and its contour plot are drawn, the peaks of the plots are optimal regions of factors. So a mathematical model predict the optimal value of factors, the experimental verification of the predicted value of factors terminate optimization.

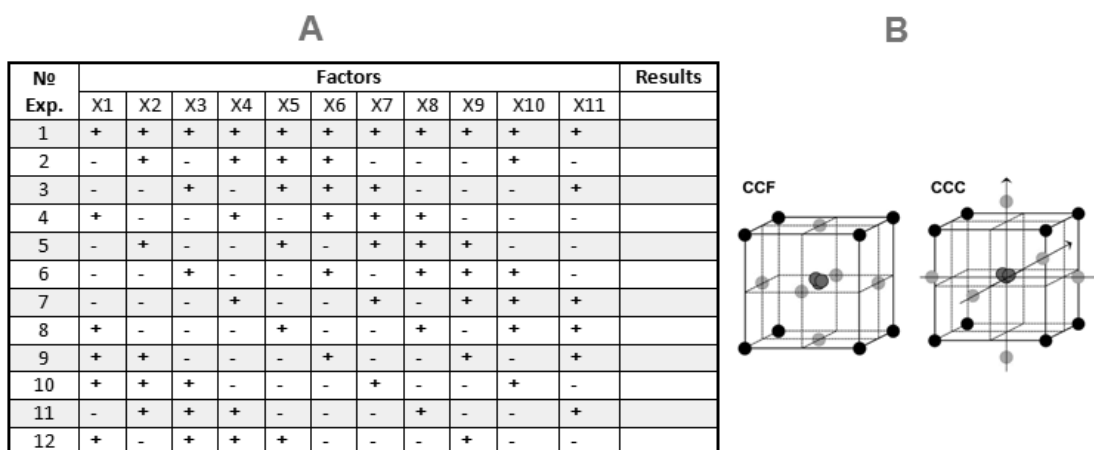


Figure 1. A) Matrix Plackett-Burman design (PBD) for screening variables. B) Two forms of Central Composite Design.

References:

1. Ob utverjdenii Pravil nadlejaschei proizvodstvennoi praktiki: [prikaz Minpromtorga Rossii ot 14.06.2013 № 916 (red. ot 18.12.2015)] [Electronic resource] // Minpromtorg Rossii. – Access mode: <http://качество.рф/documents/order> (accessed date: 10.12.2017).
2. Production of Biopharmaceuticals in E. coli: Current Scenario and Future Perspectives / M. N. Baeshen [et al.] // J. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 25(7). – P. 953–962.
3. Bioprocess Optimization Using Design-of-Experiments Methodology / C.-F. Mandenius [et al.] // Biotechnol. Prog. – 2008. – Vol. 24(6). – P. 1191–1203.
4. Periplasmic expression optimization of VEGFR2 D3 adopting response surface methodology: Antiangiogenic activity study / W.Cao [et al.] // Protein Expression and Purification. – 2013. – Vol. 90. – P. 55–66.
5. Expression and Secretion of Endostar Protein by Escherichia Coli: Optimization of Culture Conditions Using the Response Surface Methodology / A. Mohajeri [et al.] // Mol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 58(10). – P. 634–647.

УДК 579.2;577.112.6:595.782

## ИНДИКАЦИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

**Амелькина А.А., Ремизов Е.К., Ларионова О.С., Древко Я.Б., Фауст Е.А.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», Саратов, Россия  
 410012, г. Саратов, Театральная пл., 1  
 e-mail: [amelkina.alexandra2012@yandex.ru](mailto:amelkina.alexandra2012@yandex.ru)

Выделены антимикробные пептиды из биомассы личинок большой восковой моли (*Galleria mellonella*), изучена их антимикробная активность в отношении патогенных и условно-патогенных штаммов микроорганизмов.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, высокоэффективная жидкостная хроматография, антимикробная активность, штаммы микроорганизмов, большая восковая моль.

Разработка препаратов нового поколения на основе антимикробных пептидов, не оказывающих негативного влияния на микробиоценоз кишечника, является одной из актуальных задач практической ветеринарии. В целом, увеличение числа инфекционных заболеваний обусловлено ослаблением иммунного статуса животных. Важная роль в оптимизации этого процесса принадлежит восстановлению кишечного биоценоза и снижению контаминации желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) условно-патогенной микрофлорой. На фоне дисбактериоза, дефицита полезной микрофлоры, низкой резистентности организма условно-патогенная флора может проявлять вирулентные свойства и вызывать заболевания ЖКТ. Нарушение экологического равновесия между отдельными группами микроорганизмов ЖКТ приводит к развитию патологических процессов в макроорганизме. Следовательно, поиск новых антимикробных агентов биологического генеза позволит повысить эффективность проведения профилактики и терапии заболеваний.

Целью исследований явилось определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) АМП на некоторые группы микроорганизмов.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были выделены 4 белковые фракции из биомассы личинок большой восковой моли (*Galleria mellonella*).

Антимикробную активность определяли по отношению к некоторым группам грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*. Установлено, что МПК белковой фракции № 2 для *B. cereus* – 0,310 мг/мл, *St. aureus* – 0,625 мг/мл, *S. typhimurium* – 0,625 мг/мл.

В результате проведенных исследований было установлено, что выделенные АМП из биомассы личинок *Galleria mellonella*, обладают высоким уровнем антибактериальной активности, а следовательно могут быть использованы для разработки новых антимикробных препаратов

#### Литература:

1. Ana Maria Carmona-Ribeiro and Letícia Dias de Melo Carrasco. Novel Formulations for Antimicrobial Peptides // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15. P. 18040-18083.
2. Guangshun Wang, Biswajit Mishra, Kyle Lau, Tamara Lushnikova, RadhaGolla, Xiuqing Wang. Antimicrobial Peptides in 2014. // *Pharmaceuticals*. 2015. Vol. 8, P. 123-150.
3. Nicole L. van der Weerden, Mark R. Bleackley, Marilyn A. Anderson. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. Vol. 70. P. 3545-3570.
4. Крылова Л.С., Амеликина А.А., Древко Я.Б., Ларионова О.С. Изучение некоторых биологических свойств антимикробных пептидов, полученных из гемолимфы личинок *Galleria mellonella* // Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий». – 2017. – с. 263-267.
5. Пантелеев П.В., Болосов И.А., Баландин С.В., Овчинникова Т.В. Строение и биологические функции β-спиральных антимикробных пептидов // *Actanaturae*. – 2015. – Т. 7, № 1 (24). – с. 39-50.

UDC 579.2;577.112.6:595.782

## INDICATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND THE STUDY OF THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITY

**Amelkina A.A, Remizov E.K, Larionova O.S, Dereko Ya. B., Faust E.A**

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov», Saratov, Russia  
410012, Saratov, Teatralnaya square., 1  
e-mail: amelkina.alexandra2012@yandex.ru

Antimicrobial peptides were isolated from the biomass of large wax moth larvae (*Galleria mellonella*) and also was studied their antimicrobial activity against pathogenic and opportunistic strains of microorganisms.

**Key words:** antimicrobial peptides, high-performance liquid chromatography, antimicrobial activity, strains of microorganisms, large wax moth.

The developing of new-generation drugs based on antimicrobial peptides (AMP) that do not exert negative influence on the intestinal microbiocenosis, is one of the relevant objective of practical veterinary medicine. In general, the increasing of the number of infectious diseases is due to the weakening of the immune status of animals. An important role in optimizing of this process belongs to the restoration of intestinal biocenosis and to the reduction of gastrointestinal tract (GIT) contamination by a conditionally pathogenic microflora. Against the background of dysbiosis, deficiency of beneficial microflora, low resistance of the organism, the opportunistic microflora can exhibit virulent properties and cause gastrointestinal diseases. Violation of the ecological balance between individual groups of gastrointestinal organisms leads to the development of pathological processes in the macroorganism. Therefore, the search for new antimicrobial agents of biological origin will increase the effectiveness of prevention and treatment of diseases.

The goal of the research was to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of AMP on certain groups of microorganisms.

High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to isolate 4 protein fractions from the biomass of large wax moth larvae (*Galleria mellonella*).

The antimicrobial activity was determined with respect to certain groups of Gram-positive and Gram-negative microorganisms: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*. It has been established that the

MIC of the protein fraction No. 2 for *B. cereus* is 0.310 mg / ml, *St. aureus* – 0.625 mg / ml, *S. typhimurium* – 0.625 mg / ml.

As a result of our research, was found that isolated AMP from the biomass of *Galleria mellonella* larvae, have a high level of antibacterial activity, and therefore it can be used for developing new antimicrobial agents.

#### References:

1. Ana Maria Carmona-Ribeiro and Letícia Dias de Melo Carrasco. Novel Formulations for Antimicrobial Peptides // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. Vol. 15. P. 18040-18083.
2. Guangshun Wang, Biswajit Mishra, Kyle Lau, Tamara Lushnikova, Radha Golla, Xiuqing Wang. Antimicrobial Peptides in 2014. // *Pharmaceuticals*. 2015. Vol. 8, P. 123-150.
3. Nicole L. van der Weerden, Mark R. Bleackley, Marilyn A. Anderson. Properties and mechanisms of the action of naturally occurring antifungal peptides // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013. Vol. 70. P. 3545-3570.
4. Krylova L.S., Amelkina A.A., Dzhereko Ya.B., Larionova O.S.. A study of some biological properties of antimicrobial peptides derived from the hemolymph of the larvae of *Galleria mellonella* // *International scientific-practical conference «Actual problems of veterinary medicine, food and biotechnology»*. – 2017. – p. 263-267.
5. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. The structure and biological functions of  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptides // *Actanaturae*. – 2015. – T. 7, No. 1 (24). – from. 39-50.

УДК 663.1

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ РАСТВОРОВ ВЫМОРАЖИВАНИЕМ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПЕНИЦИЛЛИНАЗЫ

Фоменко И.А., Филимонова В.В., Савочкина И.В.

ОАО «Институт прикладной биохимии и машиностроения «Биохиммаш», Москва, Россия  
127299, Москва, ул. Клары Цеткин, д. 4  
e-mail: iv.fomenko@mail.ru

Использование концентрирования раствора пенициллиназы методом вымораживания для улучшения характеристик одного из этапов технологии выделения этого фермента из культуральной жидкости.

**Ключевые слова:** пенициллиназа, концентрирование, вымораживание, фермент

Пенициллиназа ( $\beta$ -лактамаза) – фермент, инактивирующий  $\beta$ -лактамы антибиотики (пенициллины, цефалоспорины), который используется в аналитических целях для контроля стерильности субстанций и лекарственных форм антибиотиков. Препараты антибиотиков инактивируют с помощью пенициллиназы, высевая образцы на питательные среды и выявляя наличие роста сопутствующих микроорганизмов, если они присутствуют в исследуемых образцах.

Производство пенициллиназы для аналитических целей в РФ в настоящее время осуществляется по технологии, описанной в патенте [1]. Для получения пенициллиназы микробиологическим путем культуру-продуцент выращивают при оптимальных для ее развития условиях, проводят микрофильтрацию культуральной жидкости на трубчатом керамическом фильтре с размером пор 0,2 мкм, полученный фильтрат подвергают ультрафильтрации на полимерном фильтре, задерживающая способность которого характеризуется номинальной отсекаемой молекулярной массой примерно 10 кДа. Полученный концентрат стерилизуют методом стерилизующей фильтрации и лиофильно высушивают. В соответствии с нормативной документацией, готовый продукт, расфасованный во флаконы, представляет собой порошок или пористую массу, содержащую пенициллиназу в количестве 1 млн.  $\pm$  15% ЕД/фл. (1 млн. ЕД  $\approx$  1,700 ME).

На стадии ультрафильтрации, после промывки контура установки стерильной дистиллированной водой, образуется разбавленный концентрат пенициллиназы с активностью 450  $\div$  550 тыс. ЕД/мл. Если содержание пенициллиназы в концентрате, полученном после ультрафильтрации, больше 1 млн. ЕД/мл, разбавленный концентрат пенициллиназы, полученный после промывки контура, добавляют в основной раствор концентрата для уменьшения потерь фермента. Если содержание пенициллиназы в концентрате меньше 1 млн. ЕД/мл, появляется необходимость в концентрировании раствора пенициллиназы, образующегося после промывки контура, до содержания пенициллиназы в растворе в количестве  $\sim$  1 млн. ЕД/мл. С этой целью авторами был использован один из известных методов концентрирования растворов ферментов – вымораживание [2].

В нашем случае содержание пенициллиназы в концентрате объемом 0,85 л составляло  $\sim$  900 тыс. ЕД/



мл. В растворе объемом 0,5 л, образовавшемся после промывки контура установки водой, содержалось 450 тыс. ЕД/мл пенициллиназы. Полученный после промывки раствор замораживали в морозильной камере при температуре минус 18 ÷ 24 °С в течение 8 часов. Замороженный раствор извлекали из морозильной камеры и оставляли при комнатной температуре на 30 ÷ 40 минут. После того, как ~ 1/3 объема раствора размораживалась, в оттаявшей жидкости активность фермента составляла 800 ~ 900 тыс. ЕД на 1 мл. Эту часть оттаявшей жидкости добавляли в основной концентрат.

Таким образом, в результате использования в технологии получения пенициллиназы метода концентрирования растворов вымораживанием выход фермента был увеличен на ~ 15%.

Литература:

1. Патент РФ № 2221041, 03.10.2002.

2. Методы выделения и очистки продуктов биотехнологических производств: Учебное пособие по курсу «Биотехнология» для студентов фармацевтического факультета. – Нижний Новгород: Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2005. – 26 с.

UDK 663.1

## USING THE METHOD OF CONCENTRATION OF SOLUTIONS BY THE FREEZING IN THE TECHNOLOGY OF MANUFACTURE OF PENICILLINASE

Fomenko I.A., Filimonova V.V., Savochkina I.V.

JSC Institute for Applied Biochemistry and Machine Engineering "Biokhimmash", Moscow, Russia  
 127299, Moscow, Klary Tsetkin str., 4  
 e-mail: iv.fomenko@mail.ru

Using concentration of the penicillinase solution by the freezing method to improve the characteristics of one of the steps in the technology of isolation of this enzyme from the culture liquid.

Keywords: penicillinase, concentration, freezing, enzyme.

Penicillinase ( $\beta$ -lactamase) is an enzyme that inactivates  $\beta$ -lactam antibiotics (penicillins, cephalosporins), which is used for analytical purposes to control the sterility of substances and dosage forms of antibiotics. Preparations of antibiotics are inactivated with penicillinase, the samples are sown to nutrient media and the presence of growth of accompanying microorganisms is detected if they are present in the test samples.

Penicillinase production for analytical purposes in the Russian Federation is currently carried out using the technology described in the patent [1]. To obtain penicillinase microbiologically, the culture-producer is grown under optimal conditions for its development, microfiltration of the culture liquid is carried out on a tubular ceramic filter with a pore size of 0.2  $\mu$ m, the resulting filtrate is subjected to ultrafiltration on a polymer filter whose retention capacity is characterized by a nominal cut off molecular mass of about 10 kDa. The resulting concentrate is sterilized by sterilizing filtration and lyophilized. In accordance with regulatory documentation, the finished product, packaged in vials, is a powder or porous mass containing penicillinase in an amount of 1 million  $\pm$  15% UN/in the vial (1 million UN  $\approx$  1,700 IU).

At the stage of ultrafiltration, after washing the contour of the unit with sterile distilled water, a diluted concentrate of penicillinase with an activity of 450 ÷ 550 thousand UN/ml is formed. If the penicillinase content in the concentrate obtained after ultrafiltration is greater than 1 million UN/ml, the diluted penicillinase concentrate obtained after washing the contour of the unit is added to the concentrate stock solution to reduce enzyme losses. If the penicillinase content in the concentrate is less than 1 million UN/ml, it becomes necessary to concentrate the penicillinase solution formed after washing the contour to a penicillinase content in the solution in an amount of ~ 1 million UN/ml. To this end, the authors used one of the known methods for concentrating enzyme by the freezing [2].

In our case, the content of penicillinase in a 0.85 liter concentrate was ~ 900 thousand UN/ml. In a 0.5 liter solution formed after washing the contour of the unit with water, 450 thousand UN/ml of penicillinase was contained. The solution obtained after washing was frozen in a freezer at minus 18 ÷ 24 °C for 8 hours. The frozen solution was removed from the freezer and left at room temperature for 30 – 40 minutes. After ~ 1/3 of the volume of the solution was thawed, in the thawed liquid the activity of the enzyme was 800 – 900 thousand UN/ml. This part of thawed liquid was added to the main concentrate.

Thus, as a result of using the method of concentration of solutions by freezing in penicillinase production, the yield of the enzyme was increased by ~ 15%.

References:

1. Patent of the Russian Federation No. 2221041, 03.10.2002.
2. Methods of isolation and purification of products of biotechnological productions: A textbook on the course "Biotechnology" for students of the pharmaceutical faculty. – Nizhny Novgorod: Publishing house of Nizhny Novgorod State Medical Academy, 2005. – 26 p.

УДК 615.281.9

## 168АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ КОЗЫ CAPRA HIRCUS

**Калашников А.А., Пантелеев П.В., Баландин С.В., Овчинникова Т.В.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10

e-mail: Kalasnikov.aa@phystech.edu

В работе исследована способность фрагментов пролин-богатого пептида козы *Capra hircus* ChBac7.5 ингибировать синтез бактериального белка и подавлять рост патогенной микрофлоры.

**Ключевые слова:** лекарственная устойчивость, врожденный иммунитет, антимикробные пептиды.

Разработка эффективных средств борьбы с патогенными микроорганизмами, обладающими множественной лекарственной устойчивостью, является одной из приоритетных задач современной биотехнологии. Природные антимикробные пептиды (АМП) являются перспективными объектами для создания антибиотиков нового поколения. Благодаря активности в отношении широкого спектра микроорганизмов и иммуномодулирующим свойствам АМП играют ключевую роль в системе врожденного иммунитета животных. Особый интерес представляют пролин-богатые АМП позвоночных животных. Их отличительной чертой является наличие повторяющейся консервативной последовательности PRP и нелитический механизм антимикробного действия. Ранее в костном мозге козы *Capra hircus* была обнаружена мРНК, кодирующая один из пептидов этого класса – ChBac7.5. В состав полноразмерной молекулы входят 60 аминокислотных остатков, в том числе 20 остатков аргинина и 23 остатка пролина. Однако из лейкоцитов животного был выделен лишь 22-членный N-концевой фрагмент (mini-ChBac7.5Nα), обладающий антимикробной активностью. Ранее нами было показано, что N-концевые 16- и 22-членные фрагменты также способны подавлять синтез бактериального белка в тестах *in vitro*.

Целью настоящей работы являлось изучение механизмов антимикробного действия пептида ChBac7.5 и его C-концевых фрагментов. В рамках исследования получены генетические конструкции для гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* BL21, а также разработана схема выделения и очистки целевых пептидов. Активность полученных АМП в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий была определена методом двойных серийных разведений в жидкой питательной среде. Для определения способности АМП подавлять синтез бактериального белка *in vitro* была использована бесклеточная белок-синтезирующая система. Сравнительные исследования функциональной активности N- и C-концевых фрагментов ChBac7.5 дополнили имеющиеся данные о механизмах антимикробного действия пролин-богатых пептидов животных.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

UDC 615.281.9

## STUDIES OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF PROLINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF THE GOAT CAPRA HIRCUS

**Kalashnikov A.A., Panteleev P.V., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V.**

Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 117997, Moscow, Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10

e-mail: Kalasnikov.aa@phystech.edu

In this work we investigated the ability of fragments of the proline-rich peptide of the goat *Capra hircus* ChBac7.5 to inhibit bacterial protein synthesis and suppress the growth of pathogenic bacteria.

**Key words:** multidrug resistance, innate immunity, antimicrobial peptides.

The development of effective means of combating pathogenic microorganisms with multiple drugs resistance is one of the priority tasks of modern biotechnology. Natural antimicrobial peptides (AMP) are promising objects for creating new generation of antibiotics. AMPs play a crucial role in the innate immunity of animals due to their activity against a broad spectrum of microorganisms and immunomodulatory properties. The proline-rich AMPs of vertebrates are of particular interest. Their distinctive features are the presence of a the repetitive conserved PRP sequence and a non-lytic mechanism of antimicrobial action. Previously, mRNA encoding one of the peptides of this class, ChBac7.5, was detected in the bone marrow of the goat *Capra hircus*. The full-length molecule contains 60 amino acid residues including 20 arginine and 24 proline residues. However, only 22-residue N-terminal fragment (mini-ChBac7.5Na) possessing antimicrobial activity was isolated from the goat leukocytes. Previously, we have shown that N-terminal 16- and 22-residue fragments were also able to inhibit the protein synthesis *in vitro*.

The aim of this work was to study the mechanism of antimicrobial action of the peptide ChBac7.5 and its C-terminal fragments. We constructed a series of plasmid vectors for heterologous expression in *E. coli* BL21 (DE3) and developed the method of purification of these peptides. The activity of AMPs against gram-negative and gram-positive bacteria was determined using microtitre broth dilution method. The cell-free protein-synthesis system was used to determine the ability of AMPs to inhibit bacterial protein synthesis. Comparative studies of the functional activity of ChBac7.5 N- and C-terminal fragments supplemented the available data on the mechanisms of antimicrobial action of proline-rich peptides of animal origin.

The work was supported by the Russian Science Foundation (the project No. 14-50-00131).

УДК 57.083.3

## МОЗАИЧНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ВИРУСА ЗИКА

Шаньшин Д.В., Казачинская Е.И., Бакулина А.Ю., Д.М. Гершони, Щербаков Д.Н.

Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п.Кольцово, Новосибирская область, Россия  
 630559, р.п.Кольцово, Новосибирская область, Россия  
 e-mail: shanshin\_dv@vector.nsc.ru

При помощи биоинформатического анализа, отобрано 8 коротких фрагментов входящих в состав белков вируса Зика. Получены нитчатые бактериофаги, содержащие смесь двух типов оболочечного белка рVIII и рекомбинантного, содержащего на N-конце отобранные пептиды. Показана способность полученных бактериофагов взаимодействовать с антителами из сывороток крови больных лихорадкой Зика.

**Ключевые слова:** ТФ-ИФА, нитчатые бактериофаги, вирус Зика, антитела, диагностика.

Методы серологической диагностики вирусных заболеваний основанный на использовании рекомбинантных аналогов вирусных белков, позволяют с высокой надежностью вести дифференциальное выявление возбудителей, на родовом и даже видовом уровне. Однако для ряда возбудителей, в связи с высоким уровнем сходства аминокислотных последовательностей белков этот подход дает сбои. Примером такой группы возбудителей являются флавивirusы. Сборка флавивирусных частиц начинается с синтеза одного полипротеина, который в дальнейшем расщепляется на 3 структурных белка (капсидный, пре-мембранный, оболочечный белок), а также на 7 неструктурных белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [1,2]. Большинство патогенных для человека флавивирусов обладают высоким сходством аминокислотных последовательностей. Поэтому для этих вирусов актуальна проблема поиска антигенов для дифференциальной серологической диагностики.

Очевидным решением проблемы, является поиск фрагментов белков вирусов обладающих максимальным различием [3]. Зачастую пептиды с высокой степенью различиями между вирусами представлены короткими последовательностями, использование которых напрямую в качестве антигенов невозможно. Это требует усилий по созданию конструкций-носителей позволяющих увеличить плотность представленности пептидов. Таким образом, целью работы было апробация в качестве носителя пептидов-фрагментов вирусного полипептид нитчатого бактериофага М13 и оптимизацию условий проведения ИФА с использованием полученных бактериофагов в качестве антигенов. Апробацию подхода было решено вести на примере вируса Зика.

На первом этапе, для выбора диагностически перспективных регионов белков вируса Зика был проведен биоинформатический анализ, позволивший отобрать 8 коротких участков-пептидов входящих в состав вирусных белков: E, C, NS1, NS2a, NS2b, NS4a, NS4b. На втором этапе на основе найденных последовательностей были получены рекомбинантные нитчатые бактериофаги, содержащие на своей поверхности смесь двух типов основного оболочечного белка pVIII, «дикого» (50%) и рекомбинантного (50%). Последний, содержал в своем составе на N-конце отобранные фрагменты вирусных белков. Для сборки подобных мозаичных частиц был использован фагмидный вектор типа p88, fth1 [4].

Для «оживления» рекомбинантных бактериофагов проводили трансформацию рекомбинантными фагмидами культуры клеток DH5 $\alpha$ F<sup>+</sup>. Все варианты оказались жизнеспособны и накапливались в культуре в количестве не менее 1012 БОЕ/мл. Все варианты были растворимы в водных растворах, и, пригодны для сорбции на поверхности иммунологических планшетов или нитроцеллюлозной мембране.

Для оптимизации условий постановки ТФ-ИФА с нитчатыми бактериофагами в качестве антигенов было решено использовать бактериофаг М13 без специфической встройки. Для постановки ИФА использовали прямой метод сорбции бактериофагов с «шахматным» титрованием. Разведение бактериофага без встройки проводили в буфере 0.1 М NaHCO<sub>3</sub> до конечной концентрации бактериофага 10<sup>9</sup> БОЕ/лунку, титровку бактериофага с последовательным двукратным разведением проводили в планшете со сменой наконечников для пипетки. Сорбцию проводили в течение ночи при 4 °С. После трехкратной промывки фосфатно солевым буфером с 20% Tween, поверхность блокировали при помощи 1% раствора казеина в фосфатном буфере с 20% Tween. После инкубации в течение 1 часа при 37°С удаляли и добавляли антитела против бактериофага М13 меченные пероксидазой хрена в различных разведениях. После инкубации 1 часа при 37 °С промывали трехкратно и добавляли жидкий субстрат на основе ТМБ, содержащего H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> для окисления субстрата. Проявление проводили в течение 15 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Блокирование ферментативной реакции проводили при помощи 1 N HCl и измеряли оптическую плотность. По результатам шахматного титрования было решено использовать бактериофаги с разведением 1/100. Далее, отработку протокола было решено вести на сыворотках животных и человека. Проведение ИФА с сыворотками, полученными после иммунизации лабораторных мышей рекомбинантными белками содержащими последовательность III домена оболочечного белка и последовательность белка NS1 вируса Зика, подтвердило специфичность реакции. Результаты ТФ-ИФА с сывороткой человека переболевшего лихорадкой Зика показали, что амплифицированные бактериофаги проявляют аффинное взаимодействие к антителам из сыворотки а и взаимодействуют с ними до разведения 1/1280.

#### Литература:

1. Chambers T. J. et al. *Flavivirus genome organization, expression, and replication* // *Annual Reviews in Microbiology*. – 1990. – Т. 44. – №. 1. – С. 649-688.
2. Xu X. et al. *Identifying candidate targets of immune responses in Zika virus based on homology to epitopes in other flavivirus species* // *PLoS currents*. – 2016. – Т. 8.
3. Владыко А. С., Фомина Е. Г., Счесленок Е. П. *Особенности использования рекомбинантных белков в диагностических тест-системах*. – 2005.
4. Enshell-Seijffers D., Smelyanski L., Gershoni J. M. *The rational design of a 'type 88' genetically stable peptide display vector in the filamentous bacteriophage fd* // *Nucleic acids research*. – 2001. – Т. 29. – №. 10. – С. e50-e50.

УДК 57.083.3

## MOSAIC BACTERIOPHAGES USAGE FOR ANTIBODIES AGAINST ZIKA VIRUS IDENTIFICATION

**Shanshin D.V., Kazachinskaya E.I., Bakulina A.Yu., D.M. Gershoni, Shcherbakov D.N.**

*Federal Budgetary Institution of Science State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»  
Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia  
630559, Koltsovo settlement, Novosibirsk region, Russia  
e-mail: shanshin\_dv@vector.nsc.ru*

With the help of bioinformatic analysis, 8 short fragments of the proteins of the Zika virus were selected. Filamentous bacteriophages containing a mixture of two types of pVIII envelope protein and a recombinant protein containing the selected peptides at the N-terminus have been obtained. The ability of the resulting bacteriophages to interact with antibodies from sera from patients with Zika fever is shown.

**Key words:** TF-ELISA, filamentous bacteriophages, Zika virus, antibodies, diagnostics.

Methods of serological diagnosis of viral diseases based on the use of recombinant analogues of viral proteins, allow for high reliability to conduct differential detection of pathogens, at the generic and even species level. However, for a number of pathogens, this approach fails because of the high level of amino acid sequence of proteins. An example of such group of pathogens is flaviviruses. The assembly of flavivirus particles begins with the synthesis of a single polyprotein, which is further split into 3 structural proteins (capsid, pre-membranous, enveloped protein), as well as 7 non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [1,2]. Most human pathogenic flaviviruses have high amino acid sequence similarity. Therefore, for these viruses the actual problem of finding antigens for differential serological diagnosis.

An obvious solution to this problem is to search for fragments of virus proteins that have the greatest difference [3]. Often peptides with a high degree of difference between viruses are represented by short sequences, the use of which directly as antigens is impossible. This requires efforts to create carrier structures that increase the density of peptide distribution. Thus, the aim of the work was to test, as a carrier, peptide fragments of the viral polypeptide of the filamentous bacteriophage M13 and optimize the conditions for carrying out ELISA using the obtained bacteriophages as antigens. Approbation of the approach was decided to lead on the example of the Zika virus.

At the first stage, a bioinformatic analysis was performed to select the diagnostic promising regions of the Zika virus proteins, which allowed selecting 8 short peptide sections that are part of the viral proteins: E, C, NS1, NS2a, NS2b, NS4a, NS4b. In the second stage, recombinant filamentous bacteriophages containing on their surface a mixture of two types of the main enveloping protein pVIII, wild (50%) and recombinant (50%) were obtained on the basis of the sequences found. The latter contained in its composition at the N-terminus selected fragments of viral proteins. To assemble similar mosaic particles, a phage vector of the type p88, fth1 [4] was used.

For the "Revitalization" of recombinant bacteriophages, transformation was carried out with recombinant phagemids of DH5aF<sup>+</sup> cell culture. All variants proved to be viable and accumulated in culture in an amount not less than 10<sup>12</sup> PFU/ml. All variants were soluble in aqueous solutions, and are suitable for sorption on the surface of immunological plates or a nitrocellulose membrane.

To optimize the conditions for the formulation of TF-ELISA with filamentous bacteriophages as antigens, it was decided to use bacteriophage M13 without specific insertion. The direct method of sorption of bacteriophages with "chess" titration was used for the formulation of ELISA. Dilution of the bacteriophage without insertion was performed in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> buffer to a final bacteriophage concentration of 10<sup>9</sup> PFU/well, titration of a bacteriophage with sequential double dilution was carried out in a plate with a change of pipette tips. Sorption was carried out overnight at 4 °C. After washing three times with phosphate buffered saline with 20% Tween, the surface was blocked with a 1% solution of casein in phosphate buffer with 20% Tween. After incubation for 1 hour at 37 °C, antibodies against bacteriophage M13 labeled with horseradish peroxidase at various dilutions were removed. After 1 hour incubation at 37 °C there were antibodies deleted and added against M13 bacteriophages which were marked with horseradish peroxidase in different breedings. After 1 hour incubation at 37 °C there were triple wash and added liquid substrate on the base of TMB which includes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to oxidize substrate. Detection was conducted during 15 min at room temperature in place isolated from light. Fermentative reaction blocking was conducted with the help of 1 N HCl and optical density was also measured. According to chess titration results, it was decided to use bacteriophages with 1/100 breeding. Further, it was decided to conduct working the protocol off with animal and human serum. IFA conduction with serums received after immunization of laboratory mouse with recombinant proteins which include shell protein III domen sequence and Zika virus NS1 protein sequence confirmed the reaction specificity. TF-IFA results with the serum of human who have had Zika fever shown that amplified bacteriophages demonstrate affine cooperation with serum antibodies and keep on cooperating with them until 1/1280 breeding.

#### References:

1. Chambers T. J. et al. *Flavivirus genome organization, expression, and replication* // *Annual Reviews in Microbiology*. – 1990. – T. 44. – №. 1. – С. 649-688.
2. Xu X. et al. *Identifying candidate targets of immune responses in Zika virus based on homology to epitopes in other flavivirus species* // *PLoS currents*. – 2016. – T. 8.
3. Владыко А. С., Фомина Е. Г., Счесленок Е. П. *Особенности использования рекомбинантных белков в диагностических тест-системах*. – 2005.
4. Enshell-Seiffers D., Smelyanski L., Gershoni J. M. *The rational design of a 'type 88' genetically stable peptide display vector in the filamentous bacteriophage fd* // *Nucleic acids research*. – 2001. – T. 29. – №. 10. – С. e50-e50.

УДК 577.1

## МОНИТОРИНГ УРОВНЯ АНТИБИОТИКОВ: ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПРЕССНЫХ МУЛЬТИПЛЕКСНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

**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: berlina.anna@gmail.com*

Разработаны иммунохроматографические тест-системы для селективного определения антибиотиков с применением коллоидного золота и квантовых точек в качестве меток. Рассмотрены возможности применения тест-систем для индивидуальной оценки эффективности антибиотикотерапии.

**Ключевые слова:** иммунохроматографический анализ, антибиотикотерапия, иммуноанализ, коллоидное золото, квантовые точки

Эффективность применения антибиотиков при терапии различных инфекций во многом определяется корректностью выбора схем применения препаратов, учитывающих индивидуальные особенности биотрансформации антибиотиков и устойчивость либо резистентность к ним возбудителей инфекции. В этой связи все более востребованными становятся средства индивидуального мониторинга динамики содержания антибиотиков в организме в ходе терапевтических мероприятий. Иммунохроматографические тесты – наиболее перспективное средство для такого мониторинга вследствие экспрессности, простоты применения и интерпретации результатов.

Представлены результаты разработки иммунохроматографических тест-систем для определения антибиотиков различных классов. Сопоставлены аналитические параметры иммунохроматографии при использовании двух видов маркеров – коллоидного золота и квантовых точек. Показано, что квантовые точки обеспечивают 10-20-кратное снижение предела обнаружения. Время анализа составляет 15-20 мин. Рассмотрены варианты мультиплексных тест-систем для контроля нескольких антибиотиков, применение иммунохроматографических тестов для одновременного мониторинга уровней антибиотиков и воспалительных маркеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение № 14.613.21.0061 от 17.07.2017, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61317X0061.

UDK 577.1

## MONITORING THE ANTIBIOTICS LEVEL: THE POSSIBILITIES OF RAPID MULTIPLEX TEST SYSTEMS

**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: berlina.anna@gmail.com*

Immunochromatographic test systems have been developed for the selective determination of antibiotics using colloidal gold and quantum dots as labels. Possibilities of application of test-systems for individual estimation of antibioticotherapy efficiency are considered.

**Key words:** immunochromatographic analysis, antibioticotherapy, immunoassay, colloidal gold, quantum dots

The effectiveness of the use of antibiotics in the treatment of various infections is largely determined by the correctness of the choice of schemes for the treatment that take into account the individual characteristics of the biotransformation of antibiotics or resistance to them of infectious agents. In this regard, the means of individual monitoring of the dynamics of the antibiotics content in the body under the treatment become more and more popular. Immunochromatographic tests are the most promising means for such monitoring due to the immediacy, ease of application and interpretation of the results.

The results of the development of immunochromatographic test systems for the determination of antibiotics of various classes are presented. The analytical parameters of immunochromatography are compared with the use of two types of markers-colloidal gold and quantum dots. It is shown that quantum dots provide a 10-20-fold decrease in the detection limit. The analysis time is 15-20 minutes. The variants of multiplex test systems for monitoring several antibiotics, the use of immunochromatographic tests for simultaneous monitoring of the antibiotics and inflammatory markers are considered.

This work was supported by the Ministry of Science and Education of Russian Federation, agreement № 14.613.21.0061 by 17.07.2017, unique identification number of the project RFMEFI61317X0061.

УДК: 577.113.5, 54.061, 54.066, ББК: 30.16

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ МЕТОДОМ ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО ГИБРИДИЗАЦИОННОГО АНАЛИЗА

А.А.Филиппова, М.Ю.Рубцова, И.П.Андреева, Г.В.Преснова, М.М.Уляшова, А.М.Егоров

Химический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3, iiffii@mail.ru, 8(495)939-2968

Разработан метод латерального проточного гибридационного анализа ДНК на тест-полосках. Идентификация ДНК проводится с использованием специфических олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных на аналитической мембране. Показана возможность использования данного метода для количественного и полуколичественного определения генов бета-лактамаз TEM типа.

**Ключевые слова:** латеральный проточный анализ, ДНК, гибридизация, наночастицы золота, антибиотикорезистентность, бета-лактамазы.

В последние годы для быстрой идентификации бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, и определения их устойчивости к антибиотикам начали активно использоваться методы молекулярно-генетического анализа, основанные на определении специфических последовательностей нуклеиновых кислот. В данной работе исследована возможность применения технологии латерального проточного анализа на тест-полосках для идентификации ДНК. Данная технология хорошо известна для определения различных биологически активных соединений с использованием специфических антител. Экспрессность и простота анализа обеспечиваются внесением всех необходимых реагентов на тест-полоску и проведением биоспецифической стадии в проточном режиме.

Для определения ДНК использовали специфические олигонуклеотидные зонды, последовательность которых была комплементарна фрагменту анализируемой ДНК-мишени. Эти зонды иммобилизовали в тестовой зоне аналитической мембраны. В качестве метки ДНК-мишени использовали биотин, который выявляли в дуплексах ДНК конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота. Образец ДНК-мишени после внесения на тест-полоску двигался по ней под действием капиллярных сил и гибридизовался с иммобилизованным зондом, если его структура комплементарна участку исследуемой ДНК.

Оптимизация методики анализа проводилась с использованием модельных олигонуклеотидных зондов и включала выбор способа предобработки аналитической мембраны, метода иммобилизации зондов и их длины, состава буферного раствора, размера наночастиц золота и соотношения реагентов при получении конъюгата. В оптимизированных условиях была получена градуировочная кривая определения модельной одноцепочечной ДНК-мишени длиной 72 основания, соответствующей участку кодирующей последовательности бета-лактамаз TEM типа. Минимально определяемая концентрация ДНК составила  $C_{min} = 20 \pm 3$  фмоль/мкл.

Разработанная методика была использована для определения генов бета-лактамаз TEM типа, ответственных за развитие устойчивости граммотрицательных бактерий к бета-лактамам антибиотикам. Процесс пробоподготовки заключался в выделении ДНК из штаммов-продуцентов рекомбинантных бета-лактамаз и клинических образцов и получении двухцепочечных и одноцепочечных фрагментов гена бета-лактамаз TEM типа методом ПЦР. В процессе ПЦР в ампликон вводили биотин. Далее проводили анализ полученных ампликонов на тест-полоске. Время анализа образца на полоске составило 15 мин. Показано, что разработанный метод обладает высокой специфичностью и чувствительностью.

Выводы: Оптимизированы условия гибридационного анализа ДНК на пористых мембранных носителях, разработана тест-полоска для определения модельной одноцепочечной ДНК. Минимально определяемая концентрация ДНК длиной 72 основания составила  $C_{min} = 20 \pm 3$  фмоль/мкл. Показана возмож-

ность определения генов бета-лактамаз TEM-типа методом латерального проточного гибридизационного анализа.

**Финансирование:** Работа выполнялась в рамках Госрегистрационной темы AAAA-A16-116052010081-5.

UDC 577.113.5, 54.061, 54.066, BBK 30.16

## DETERMINATION OF BETA-LACTAMASE GENES BY LATERAL FLOW HYBRIDIZATION ASSAY

**A.Filippova, M.Rubtsova, I.Andreeva, G.Presnova, M.Ulyashova, A.Egorov**

*Chemistry Department of M.V. Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory, 1, 3*

A method for lateral flow analysis of DNA was developed. Specific oligonucleotides that were immobilized on the membrane were used for the determination. The possibility of using this method for the determination of the beta-lactamase genes of TEM type was shown.

**Key words:** lateral flow assay, DNA, hybridization, gold nanoparticles, antibiotic resistance, beta-lactamases

In recent years, rapid methods for detection of pathogenic bacteria are of great importance for clinical microbiological laboratories. In this research, the application of the lateral flow technique for identification of DNA has been shown. This technology has been known for a long time and is widely used to determine various compounds with specific antibodies. Short assay time and simplicity of the method is provided by including all the components inside the strip. Biospecific recognition is performed in a flow mode.

Specific oligonucleotide probes complementary to the fragment of target DNA were used for identification. They were immobilized on the analytical zone of the membrane. Biotin was incorporated in the target DNA as a label, and it was developed in DNA duplexes by the conjugate of streptavidin with the gold nanoparticles. Target DNA sample moved along the strip by capillary forces. Target DNA hybridized with an immobilized probe in the test spot if it has a fragment complementary to the probe.

In this research we optimized the technique of membrane treatment, the method of immobilization of a specific probe and its length, buffer composition and the size of gold nanoparticles. Under optimized conditions, a calibration curve was obtained for the determination of a single-stranded DNA target with a length of 72 bases, which corresponds to the region of the coding sequence of TEM type beta-lactamases. The minimum detectable DNA concentration was  $C_{min} = 20 \pm 3 \text{ fmol}/\mu\text{L}$ .

This technique was applied for the determination of genes of TEM-type beta-lactamase responsible resistance of gram-negative bacteria to beta-lactam antibiotics. The sample preparation process consisted of DNA isolation from the cells-producers of recombinant beta-lactamases and clinical samples. Then, a PCR reaction was carried out to obtain double-stranded and single-stranded fragments of the TEM-type beta-lactamase gene. During the reaction, a biotin label was incorporated into the amplicon. The amplicons were analyzed on a test strip. The assay time for the test strip took 15 minutes. The developed method has high specificity and sensitivity.

Conclusions: the conditions of hybridization analysis of DNA on porous membrane supports were optimized. A test strip was developed for the determination of model single-stranded DNA. The minimum detectable DNA concentration was  $C_{min} = 20 \pm 3 \text{ fmol}/\mu\text{L}$ . The possibility of determining the TEM-type beta-lactamase genes by lateral flow hybridization assay was shown.

**Grant:** The work was supported by the theme AAAA-A16-116052010081-5.



УДК: 615.012.6, 615.012.8, ББК: 30.16

## ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА $\alpha$ -2b БЕЗ N-КОНЦЕВОГО МЕТИОНИНА

А.Ф.Елгина, Е.В.Демьянова, Е.С.Денисенко, В.И.Лисицкая, С.В.Мартюшин, Т.О.Антипова, А.Е.Полоцкий, Е.А.Протасов, Я.А.Забродская, И.Н.Горбунова, А.М.Ищенко

ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Россия, 197110, Санкт-Петербург, Пудожская, 7, [alienv@inbox.ru](mailto:alienv@inbox.ru), 89219259737

Изучено влияние условий культивирования на наличие интерферона  $\alpha$ -2b с N-концевым метионином. Подобраны условия для биосинтеза интерферона  $\alpha$ -2b без N-концевого метионина в растворимом виде. Разработана технология выделения и очистки интерферона  $\alpha$ -2b, продуцируемого клетками *E.coli* в растворимой форме.

**Ключевые слова:** интерферон  $\alpha$ -2b, N-концевой метионин, *Escherichia coli*, ионообменная хроматография, растворимый белок

При суперэкспрессии рекомбинантного интерферона  $\alpha$ -2b (IFN  $\alpha$ -2b) в клетках *Escherichia coli* BL21 DE3 происходит накопление двух форм интерферона с N-концевым метионином (IFN met  $\alpha$ -2b) и без него. Согласно современным требованиям к качеству IFN  $\alpha$ -2b наличие N-концевого метионина является нежелательным. На настоящий момент данная проблема решалась за счет создания новых генетических конструкций [1], дополнительной обработки ферментами [2] или использования дополнительных стадий очистки с использованием дорогостоящего оборудования.

Цель данной работы заключалась в получении IFN  $\alpha$ -2b без N-концевого метионина путем оптимизации условий культивирования штамма-продуцента.

В ходе работы было изучено влияние ряда параметров процесса культивирования на качество целевого белка, а именно: аэрация, состав питательной среды, температура культивирования.

Культивирование проводилось в колбах на качалке и в ферментере BioFlo 110 (New Brunswick) объемом 14 л. Наличие N-концевого метионина оценивалось как с помощью ВЭЖХ в обратной фазе, так и с помощью MALDI масс-спектрометрии в линейном режиме (масс-спектрометр «UltrafleXtreme», Bruker, Германия).

Снижение аэрации за счет увеличения фзагр. с 0,125 до 0,250 и 0,5 привело к увеличению содержания IFN met  $\alpha$ -2b. Культивирование на минимальной питательной среде (M9+ вместо 1,5LB+M9+) существенно снижало выход IFN  $\alpha$ -2b в целом, причем доля IFN met  $\alpha$ -2b не уменьшалась. Внесение добавки из 11 микроэлементов (ионы двухвалентных металлов) не повлияло на содержание IFN met  $\alpha$ -2b. Повышение температуры культивирования с 37 до 42 оС привело к значительному снижению общего выхода IFN  $\alpha$ -2b. Только понижение температуры (30 оС) вызвало существенное снижение содержания N-концевого метионина, при этом скорость синтеза интерферона замедлялась. Было выдвинуто предположение о том, что полное отщепление N-концевого метионина не достигается из-за быстрой упаковки белка в ТВ. Понижение температуры культивирования с 37 оС до 25 оС в течение стадии индукции синтеза белка привело к накоплению целевого белка в растворимой форме. При этом как по результату анализа ВЭЖХ, так и MALDI масс-спектрометрии получаемый интерферон альфа-2b является аналогом стандартного образца интерферона альфа-2b (EDQM, EP).

Была оптимизирована существующая технология выделения и очистки: исключены стадии денатурации и ренатурации; оптимизирована стадия сульфат-аммонийного осаждения; введена стадия «дозревания» белка для образования дисульфидных связей (двое суток при + 5 оС в буферном растворе, содержащем 0,5 М аргинин и 15 мМ глутоксим); разработана схема 2-стадийной хроматографической очистки: основная очистка от неспецифических примесей на сильном катионите SpFF-сефарозе, от примесей интерфероновой природы - на сильном анионите QFF-сефарозе.

1. Подобраны условия культивирования (снижение температуры до 25 оС на протяжении индукции), при которых накапливаемый интерферон  $\alpha$ -2b соответствует стандарту, рекомендованному EPH. 2. Оптимизирована технология выделения и очистки на малом объеме (до 20 г биомассы, 40 мг очищенного интерферона) Выход интерферона альфа-2b 98 % чистоты составил 2 мг интерферона альфа-2b с 1 г биомассы. 3. Идет масштабирование технологии выделения и очистки с целью выхода на производственную мощность 1 г интерферона альфа-2b за цикл.

*Литература:*

1. Стратонова Н. В. Разработка технологии промышленного производства безметионинового интерферона альфа-2b и альфа-2a: дис. канд. биол. наук. – М, 2013. – С. 48-59. 2. Широков Д. А., Рябиченко В. В., Акишина Р. И., Оспельникова Т. П., Глазунов А. В., Честухина Г. Г., Вейко В. П. Создание штаммов-продуцентов гибридных интерферонов альфа-2 человека и использование фермента энтеропептидазы для получения интерферонов без N-концевого остатка метионина // Молекулярная биология – 2011. - Т. 45, № 3 - С. 466-471.2.

**Финансирование:** Средства института

UDC 615.012.6, 615.012.8, ВВК 30.16

## OPTIMIZATION OF MANUFACTURING TECHNOLOGY FOR PRODUCTION INTERFERON ALPHA-2B WITHOUT N-TERMINAL METHIONINE

**A.Elgina, E. Demyanova, E.Denisenko, V.Lisitskaya, C. Martyushin, T.Antipova, A. Polotsky, E.Protasov, Y.Zabrodskaya, I.Gorbunova, A.Ishchenko**

State Research Institute of Highly Pure Biopreparation of FMBA of Russia, Russia, 197110, St. Petersburg, Pudozhskaya, 7

The influence of cultivation conditions on the presence of interferon  $\alpha$ -2b with N-terminal methionine was studied. It was shown that a decrease in temperature from 37 to 25 ° C during induction promotes the biosynthesis of the soluble form of interferon  $\alpha$ -2b without N-terminal methionine. A technology for the purification of interferon  $\alpha$ -2b, produced by E. coli cells in soluble form, has been developed.

**Key words:** interferon  $\alpha$ -2b, N-terminal methionine, Escherichia coli, ion chromatography, soluble protein.

When the recombinant interferon  $\alpha$ -2b (IFN $\alpha$ -2b) is overexpressed in cells of Escherichia coli BL21 DE3, two forms of interferon with N-terminal methionine (IFNmet  $\alpha$ -2b) and without it accumulate. According to modern requirements for the quality of IFN  $\alpha$ -2b, the presence of N-terminal methionine is undesirable. To date, this problem has been addressed by creating new genetic constructs [1], additional enzymatic processing [2] or using additional purification steps using expensive equipment.

The aim of this study was in production IFN  $\alpha$ -2b without N-terminal methionine by optimizing the culture conditions of the producer strain.

In the course of the work, the influence of a number of parameters of the cultivation process on the quality of the target protein was studied, namely: aeration, nutrient medium composition, cultivation temperature.

Cultivation was carried out in flasks on a rocking chair and in a fermenter BioFlo 110 (New Brunswick) with a volume of 14 liters. The presence of N-terminal methionine was assessed by both reverse phase HPLC and MALDI mass spectrometry in linear mode (UltrafleXtreme mass spectrometer, Bruker, Germany).

Reduction of aeration due to an increase in the phase. from 0.125 to 0.250 and 0.5 resulted in an increase in the content of IFN met  $\alpha$ -2b. Cultivation on a minimal nutrient medium (M9 + instead of 1.5LB + M9 +) significantly reduced the yield of IFN $\alpha$ -2b as a whole, with the proportion of IFN met  $\alpha$ -2b not decreasing. The addition of 11 trace elements (divalent metal ions) did not affect the content of IFN met  $\alpha$ -2b. An increase in the culture temperature from 37 to 42 ° C led to a significant decrease in the overall yield of IFN  $\alpha$ -2b. Only a decrease in temperature (30 ° C) caused a significant decrease in the content of N-terminal methionine, while the rate of interferon synthesis slowed down. It was suggested that complete cleavage of the N-terminal methionine is not achieved because of the rapid packing of the protein in the TV. Lowering the culture temperature from 37 ° C to 25 ° C during the induction stage of protein synthesis led to the accumulation of the desired protein in a soluble form. In this case, both the result of HPLC analysis and MALDI mass spectrometry, the interferon alpha-2b obtained is an analog of the standard interferon alpha-2b sample (EDQM, EP).

The production technology of purification has been optimized: the stages of denaturation and renaturation are excluded; the sulfate-ammonium precipitation stage is optimized; the stage of "ripening" of the protein for the formation of disulfide bonds (two days at + 5 ° C in a buffer solution containing 0.5 M arginine and 15 mM glutoxim) was introduced; a 2-stage chromatographic purification scheme was developed: the main purification from nonspecific impurities on the strong cation exchanger SpFF-Sepharose, from interferon-type impurities - on a strong anionite QFF-Sepharose.

1. The conditions of cultivation (reduction of temperature to 25 ° C during the induction) are selected, at which the accumulated interferon  $\alpha$ -2b corresponds to the standard recommended by EPh. 2. The technology of purification on a small volume (up to 20 g of biomass, 40 mg of purified interferon) The yield of interferon alpha-2b of 98% purity was 2 mg

interferon alpha-2b with 1 g biomass. 3. The technology of purification is being scaled in order to reach the production capacity of 1 g of interferon alpha-2b per cycle.

*References:*

1. Stratonova NV Development of technology of industrial production of interferon alpha-2b and alpha-2a without metionin: dis. Cand. Biol. sciences. - M, 2013. - P. 48-59. 2. Shirokov DA, Ryabichenko VV, Akishina RI, Ospelnikova TP, Glazunov AV, Chestukhina GG, Veiko VP Production of strains producing hybrid alpha interferons -2 human and the use of the enzyme enteropeptidase for the production of interferons without the N-terminal methionine residue // Molecular biology - 2011. - T. 45, № 3 - С. 466-471.2.

**Grant:** resources of the Institute

УДК 615.371:616-022.7

## ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ

**Михайлова Н.А., Солдатенкова А.В., Зимина Е.М., Калиниченко Е.М., Калошин А.А.**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия  
105064, г. Москва, М. Казенный пер., 5а  
Sol.alena.v@yandex.ru

Получены три серии рекомбинантной вакцины синегнойной предназначенной для профилактики синегнойной инфекции. Показана безопасность опытных серий вакцины, по показателям острая и хроническая токсичность.

**Ключевые слова:** Pseudomonas aeruginosa, рекомбинантная вакцина синегнойная, острая токсичность, хроническая токсичность

В ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова в течение ряда лет проводились исследования по получению и изучению иммуногенности и протективных свойств некоторых рекомбинантных антигенов Pseudomonas aeruginosa. В результате определен состав кандидатной рекомбинантной вакцины синегнойной (РВС), включающий анатоксин и белок наружной мембраны, сорбированные на геле гидроксида алюминия. Вакцина предназначена для профилактики синегнойных инфекций. В 2017 году получены три экспериментальные серии препарата и проведено изучение их безвредности. Безопасность вакцины оценивали по показателям острой и хронической токсичности на двух видах животных (мыши и морские свинки) с учетом веса и пола особей.

При оценке острой токсичности испытаны две дозы РВС: минимальная, равная 1 «человеко-дозе» (ч.д.), и максимальная – 10 ч.д. Препарат вводили подкожно и внутривенно в объеме 0,5 мл. В течение двух недель наблюдали за общим состоянием животных. На 7-е и 15-е сутки производили взвешивание животных, оценку гематологических показателей (общий и биохимический анализы крови), патоморфологические и гистологические исследования.

При оценке хронической токсичности вакцину вводили ежедневно в течение 10 суток. На 11 день исследования животных подвергали эвтаназии с осмотром макроповреждений органов, отбирали пробы для гематологического и биохимического исследования.

В результате проведенных испытаний трех серий рекомбинантной вакцины синегнойной, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой, не выявлено достоверно значимых патологических изменений при изучении острой и хронической токсичности, о чем свидетельствовало отсутствие значимых изменений со стороны гематологических и биохимических показателей и патоморфологической картины внутренних органов. Полученные результаты позволяют считать препарат безопасным.

Работа выполнена в соответствии с Государственным Контрактом от 28 апреля 2017 г. № 14.N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».

UDC 615.371:616-022.7

## EVALUATION OF THE SAFETY OF PSEUDOMONAS RECOMBINANT VACCINE

Michailova N.A., Soldatenkova A.V., Zimina E.M., Kalinichenko E.O., Kaloshin A.A

*The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow*

Three series of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* vaccine intended for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection were obtained. The safety of experimental series of the vaccine on rates of acute and chronic toxicity was shown.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, recombinant *Pseudomonas* vaccine, acute toxicity, chronic toxicity

Investigation for obtain and study the immunogenicity and protective properties of certain recombinant *Pseudomonas aeruginosa* antigens has been conducted for a number of years in Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. As a result, the composition of the candidate recombinant *Pseudomonas* vaccine (RPV), including an toxoid and an outer membrane protein adsorbed on an aluminum hydroxide gel, was determined. The vaccine is intended for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections. In 2017, three experimental series of the vaccine were obtained and their safety was studied. The safety of the vaccine was assessed using acute and chronic toxicity in two species of animals (mice and guinea pigs), taking into account the weight and sex of individuals.

There are two doses of RPV were examined in an acute toxicity experiment: a minimum dose equal to 1 "human-dose" (HD), and a maximum of 10 HD. The vaccine was administered subcutaneously and intraperitoneally in a volume of 0.5 ml. Within two weeks, the general condition of the animals was observed. On the 7th and 15th day animals were weighed, hematological parameters were evaluated (general and biochemical blood tests), pathomorphological and histological studies were performed.

Vaccine was administered daily for 10 days in an chronic toxicity assessing. On day 11 animals were subjected to euthanasia with examination of macro damage of organs, samples were taken for hematological and biochemical studies.

As a result of tests of three series of recombinant *Pseudomonas* vaccine, intended for the prevention of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, no significant pathological changes were detected in the study of acute and chronic toxicity, as evidenced by the absence of significant changes from hematological and biochemical indicators and pathomorphological picture of internal organs. The results obtained make the preparation safe.

The work was carried out in accordance with the State Contract No. 14N08.11.0135 of April 28, 2017, within the framework of the Federal Program "Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period until 2020 and beyond" on the theme "Preclinical studies of vaccines based on recombinant protective antigens, designed to prevent infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*"

УДК 577.151.042; 579.873.21

## ПОИСК СЕЛЕКТИВНЫХ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТОВ ПАТОГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОИНФОРМАТИКИ И МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Швядас В. К., Суплатов Д. А., Нилов Д. К., Балдин С. М., Гущина И. В., Щербакова Т. А., Шмальгаузен Е. В.

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва 119991, Ленинские горы д. 1, стр. 73, e-mail: vyatas@belozersky.msu.ru*

Разработана методология поиска селективных ингибиторов ферментов, созданный подход применен для компьютерного дизайна ингибиторов глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, транскетолазы и L,D-транспептидазы из *Mycobacterium tuberculosis*. Эффективность наиболее перспективных соединений подтверждена экспериментально как по отношению к выделенным ферментам патогена, так и по способности подавлять рост возбудителя туберкулеза. Методология реализована в виде он-лайн платформы из 4-х общедоступных веб-серверов, представляющей возможность применения биоинформатических методов для изучения структурного и функционального разнообразия ферментов, поиска и аннотации новых центров связывания лигандов в их структурах.

**Ключевые слова:** ингибиторы ферментов; молекулярное моделирование; методы биоинформатики.

До недавнего времени при поиске средств подавления активности ферментов патогенов основное внимание было сосредоточено на конкурентных ингибиторах, способных предотвратить взаимодействие с субстратами и кофакторами. В то же время анализ белковых структур показывает, что наряду с активными центрами ряд ферментов содержит множественные участки связывания, роль которых неизвестна [1]. Мы предлагаем использовать методы системной биологии и молекулярного моделирования для классификации неизвестных участков связывания в структуре белков и идентификации наиболее важных участков для функции, чтобы затем провести поиск комплементарных им лигандов, способных модулировать свойства ферментов. Для этой цели разработана методология поиска селективных ингибиторов ферментов, которая реализована в виде он-лайн платформы из 4-х общедоступных веб-серверов (Mustguseal [2], visualCMAT [3], Zebra [4] и pocketZebra [5]), представляющая возможность применения биоинформатических методов для изучения структурного и функционального разнообразия ферментов, поиска и аннотации новых центров связывания лигандов. Он-лайн платформа позволяет анализировать большие выравнивания, построенные Mustguseal, для выявления общих, специфических и ко-эволюционирующих признаков организации разных сайтов в родственных белках человека, животных и микроорганизмов. Ключевой веб-сервер Mustguseal позволяет автоматически строить выравнивания больших суперсемейств белков с использованием информации об их структурах и последовательностях в публичных базах данных, а методы visualCMAT, Zebra и pocketZebra способны помочь при аннотации новых сайтов и изучении молекулярного механизма регуляторной коммуникации между ними. Разработанный подход представляет универсальную методологию поиска селективных лигандов/ингибиторов – прототипов новых лекарственных препаратов. С его использованием охарактеризован ранее не изучавшийся центр связывания SSPoc1 в структуре глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, способный регулировать подвижность функционально важной петли; показано, что структурная организация участков SSPoc1 отличается в ферментах патогена и человека, что создало предпосылки для дизайна селективных ингибиторов. В случае транскетолазы из *Mycobacterium tuberculosis* обнаружен важный гидрофобный кластер на границе активного центра, отсутствующий в ферменте человека. Разработаны молекулярные модели ферментов, для поиска новых ингибиторов созданы фокусированные *in silico* библиотеки потенциальных лигандов, проведен их компьютерный скрининг, отобраны соединения для экспериментального изучения, эффективность наиболее перспективных ингибиторов подтверждена как по отношению к выделенным ферментам патогена, так и по подавлению роста возбудителя туберкулеза.

Исследования поддержаны Российским научным фондом (грант 15-14-00069-П)

#### Литература:

1. Suplatov D., Švedas V. Study of functional and allosteric sites in protein superfamilies // *Acta Naturae*. – 2015. – Vol. 7. – №. 4 (27). – P. 34-45.
2. Suplatov D., Kopylov K., Popova N., Voevodin V., Švedas V. Mustguseal: Server for Multiple Structure-Guided Sequence Alignments of Protein Families // *Bioinformatics*. – 2018. – DOI:10.1093/bioinformatics/btx831.
3. Suplatov D., Sharapova Y., Timonina D., Kopylov K., Švedas V. The visualCMAT: a web-server to select and interpret correlated mutations/co-evolving residues in protein families // *J. Bioinform. Comput. Biol.* – 2018. – DOI: 10.1142/S021972001840005X
4. Suplatov D. et al. Zebra: a web server for bioinformatic analysis of diverse protein families // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2014. – Vol. 32. – №. 11. – P. 1752-1758.
5. Suplatov D. et al. pocketZebra: a web-server for automated selection and classification of subfamily-specific binding sites by bioinformatic analysis of diverse protein families // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – №. W1. – P. W344-W349.

UDC 577.151.042; 579.873.21

## SEARCH FOR SELECTIVE INHIBITORS OF PATHOGEN ENZYMES USING METHODS OF BIOINFORMATICS AND MOLECULAR MODELING

Švedas V. K., Suplatov D. A., Nilov D. K., Baldin S. M., Gushchina I. V., Shcherbakova T. A., Schmalhausen E. V. Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow 119991, Lenin Hills 1, Bldg.73, e-mail: vytas@belozersky.msu.ru

A methodology has been developed for the search of selective enzyme inhibitors, the approach was applied for the computational design of inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, transketolase and L,D-

transpeptidase from *Mycobacterium tuberculosis*. The effectiveness of the most promising compounds has been confirmed experimentally both in inhibition of the isolated enzymes from the pathogen, and in the ability to suppress the growth of the causative agent of tuberculosis. The methodology was implemented as an on-line platform of 4 public web servers, representing the possibility of using bioinformatic methods to study the structural and functional diversity of enzymes, search and annotation of new ligand binding sites in their structures.

**Key words:** enzyme inhibitors; molecular modeling; methods of bioinformatics.

Until recently, when looking for means to suppress the activity of pathogen enzymes, the focus was on competitive inhibitors that could prevent interaction with substrates and cofactors. At the same time, analysis of protein structures shows that along with active centers, a number of enzymes contain multiple binding sites, the role of which is unknown [1]. We suggest to use systems biology and molecular modeling techniques to classify unknown binding sites in the protein structure and identify the most important sites for the function in order to search then for complementary ligands capable of modulating the properties of enzymes. For this purpose, a methodology has been developed for the search of selective enzyme inhibitors, which was implemented as an on-line platform of 4 public web servers (Mustguseal [2], visualCMAT [3], Zebra [4] and pocketZebra [5]), that allows to apply bioinformatic methods for studying the structural and functional diversity of enzymes, search and annotation of new ligand binding sites. The on-line platform allows one to analyze the large alignments built by Mustguseal to identify common, specific and co-evolving signs in the organization of different sites in related human, animal and microbial proteins. A key web server, Mustguseal, automatically builds alignments for large superfamilies of proteins using information about their structures and sequences in public databases, whereas visualCMAT, Zebra and pocketZebra methods can help in annotating new sites and studying the molecular mechanism of regulatory communication between them. The developed approach represents a universal methodology for the search of selective ligands / inhibitors - prototypes of new drugs. With its use, the previously unknown binding site of SSPoc1 in the structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, which is capable of regulating the mobility of a functionally important loop, was characterized; It was shown that the structural organization of SSPoc1 sites is different in the pathogen and human enzymes, what created the prerequisites for the design of selective inhibitors. In the case of transketolase from *Mycobacterium tuberculosis*, an important hydrophobic cluster was found at the active site boundary, which is absent in the human enzyme. The molecular models of enzymes have been developed and the focused in silico libraries of potential ligands have been created to search for new inhibitors, their computer screening has been carried out and the selective compounds have been chosen for experimental study. The effectiveness of the most promising inhibitors has been confirmed both in inhibition of the isolated pathogen enzymes and in suppression of the growth of the causative agent of tuberculosis.

The research was supported by the Russian Science Foundation (grant 15-14-00069-P)

#### References:

1. Suplatov D., Švedas V. Study of functional and allosteric sites in protein superfamilies // *Acta Naturae*. – 2015. – Vol. 7. – №. 4 (27). – P. 34-45.
2. Suplatov D., Kopylov K., Popova N., Voevodin V., Švedas V. Mustguseal: Server for Multiple Structure-Guided Sequence Alignments of Protein Families // *Bioinformatics*. – 2018. – DOI:10.1093/bioinformatics/btx831.
3. Suplatov D., Sharapova Y., Timonina D., Kopylov K., Švedas V. The visualCMAT: a web-server to select and interpret correlated mutations/co-evolving residues in protein families // *J. Bioinform. Comput. Biol.* – 2018. – DOI: 10.1142/S021972001840005X
4. Suplatov D. et al. Zebra: a web server for bioinformatic analysis of diverse protein families // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2014. – Vol. 32. – №. 11. – P. 1752-1758.
5. Suplatov D. et al. pocketZebra: a web-server for automated selection and classification of subfamily-specific binding sites by bioinformatic analysis of diverse protein families // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42. – №. W1. – P. W344-W349.

УДК 615.37

## ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ II ФАЗЫ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИЧ «ДНК-4»

**Акулова Е.Б., Мурашев Б.В., Веревошкин С.В., Машарский А.Э., Аль-Шехадат Р.И., Поддубный В.А., Зозуля О., Востокова Н.В., Козлов А.П.**

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия.

197110 Россия, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7

Частное научно-исследовательское учреждение «Биомедицинский центр», Санкт-Петербург, Россия.

194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Выборгская, д8.

Общество с ограниченной ответственностью «Инновационная Фармацевтика» (Компания ИФАРМА), Москва, Россия.

143026, Россия, г. Москва, Инновационный Центр «Сколково», ул. Нобеля, д. 7

e-mail: [ekaterina.akul@gmail.com](mailto:ekaterina.akul@gmail.com)

Получены результаты клинических испытаний II фазы свидетельствующие, что терапевтическая ДНК-вакцинация, осуществляемая на фоне кАРТ, у ряда пациентов может приводить к разрушению латентных вирусных резервуаров, что сопровождается реактивацией провирусных геномов и/или освобождением латентных вирусных РНК.

**Ключевые слова:** ВИЧ, СПИД, ДНК-вакцина, клинические исследования, латентные вирусные резервуары, антиретровирусная терапия.

**Введение:** Со времени выделения СПИДа как самостоятельного заболевания в мире официально зарегистрировано около 60 миллионов ВИЧ-инфицированных человек, из них около 30 миллионов умерло от СПИДа.

ГосНИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России и Биомедицинским центром разработана ДНК-вакцина «ДНК-4», которая представляет собой смесь четырех плазмидных ДНК, которые, попадая в клетки вакцинируемого организма, синтезируют в них вирусные белки Nef, Gag, Pol (rt) и gp140. В 2011 году вакцина «ДНК-4» успешно прошла I фазу клинических испытаний, в ходе которых были показаны ее безопасность и иммуногенность. В настоящее время вакцина «ДНК-4» завершила II фазу клинических испытаний, которые проводились в рамках протокола «Многоцентровое, двойное-слепое, плацебо-контролируемое исследование безопасности, иммуногенности и подбора оптимальной дозировки вакцины ДНК-4 у пациентов с ВИЧ-1, получающих стабильную антиретровирусную терапию (АРТ) первой линии».

**Цель:** Целями исследования являлась оценка безопасности и иммуногенности различных режимов дозирования вакцины «ДНК-4» у пациентов с ВИЧ-1, получающих АРТ первой линии, оценка влияния вакцины «ДНК-4» на динамику вирусной нагрузки и уровень цитотоксических и хелперных Т-клеток.

**Методы:** В ходе исследования оценивалась безопасность различных режимов дозирования вакцины «ДНК-4» у пациентов с ВИЧ-1, получающих АРТ первой линии, на основании частоты и степени тяжести нежелательных явлений, зарегистрированных в течение всего периода исследуемой терапии и последующего наблюдения. Для оценки иммуногенности изучался уровень цитотоксических (CD3+CD8+) и хелперных (CD3+CD4+) Т-клеток, динамика вирусной нагрузки, в том числе частота повышения вирусной нагрузки выше 50 копий/мл, так называемые «blips», которые связывают с формированием возвратной вiremии и лекарственной устойчивости.

**Результаты:** В исследование были рандомизированы 54 пациента (по 17 пациентов в группы ДНК-4 0,25 мг и ДНК-4 0,5 мг, 20 пациентов в группу Плацебо). Пациенты каждой группы проходили четырехкратную иммунизацию в дни 0, 7, 11, 15, после которых наступал период наблюдения продолжительностью 24 недели.

Было установлено, что препарат ДНК-4 в различных режимах дозирования 0,25 мг и 0,5 мг у пациентов с ВИЧ-1, получавших АРТ первой линии, продемонстрировал высокий профиль безопасности и хорошую переносимость.

Получены результаты, свидетельствующие, что терапевтическая ДНК-вакцинация, осуществляемая на фоне АРТ, у ряда пациентов может приводить к разрушению латентных вирусных резервуаров, что сопровождается реактивацией провирусных геномов и/или освобождением латентных вирусных РНК.

**Заключение/выводы:** Необходимы дальнейшие исследования, чтобы выяснить, приводит ли ДНК-вак-

цинация (или повторная ДНК-вакцинация) на фоне КАРТ к полному освобождению от ВИЧ-1 (eradication) и уничтожению латентных вирусных резервуаров у некоторых пациентов.

UDC 615.37

## PRELIMINARY RESULTS OF PHASE II CLINICAL TRIAL OF CANDIDATE HIV VACCINE "DNA-4"

**Akulova E.B., Murashev B.V., Verevchkin S.V., Masharsky A.E., Al-Shekhadat R.I., Poddubnyy V.A., Zozulya O.V., Vostokova N.V., Kozlov A.P.**

*State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia.  
197110 Russia, St. Petersburg, Pudozhskaya street, 7  
The Biomedical Center  
194044, Russia, St. Petersburg, Viborgskaya street, 8.  
Limited Liability Company "Innovative Pharma"  
143026, Russia, Moscow, Nobel street, 7, Skolkovo Innovative Centre  
e-mail: ekaterina.akul@gmail.com*

The results of phase II clinical trial were obtained. The data suggest the possible influence of therapeutic DNA vaccination on viral reservoirs in some patients on HAART. This influence is associated with the reactivation of proviral genomes and / or the release of latent viral RNAs.

**Key words:** HIV, AIDS, DNA vaccine, clinical trials, latent viral reservoirs, antiretroviral therapy.

Background: Since AIDS was discovered in 1981 in the world, according to WHO, about 60 million HIV-infected people have been officially registered, And about 30 million died of AIDS. Despite all efforts, the pandemic of HIV infection can not be stopped. The development of vaccines against HIV/AIDS is one of the impotent steps in this field.

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations and The Biomedical Center developed the DNA vaccine "DNA-4" which consists of 4 plasmid DNA encoding Nef, Gag, Pol(rt) and gp140 HIV-1 proteins.

In 2011 the phase I clinical trial of "DNA-4" was conducted. The vaccine was find to be safe and immunogenic.

To date phase II clinical trial "DNA-4" has finished. This was a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled Phase II clinical trial. The safety, immunogenicity and dose analysis for HIV-1 infected people on HAART were determined

Aim: The study was conducted to study the safety, tolerability and immunogenicity of different doses of the candidate vaccine in HIV-infected patients on HAART. We also investigated the dynamics of viral load (including blips  $\geq 50$  copies/ml), cytotoxic and helper T cells and pharmacokinetics of the vaccine.

Методы: In the study frequency and severity of adverse events according to subjective complaints, physical examination, and laboratory tests were registered to assess safety of different vaccine doses for HIV infected people on HAART. To analyse immunogenicity of the vaccine the number of cytotoxic and helper T cells was measured. The dynamics of viral load including the frequency of blips above 50 copies/ml, was studied. Such blips are associated with viral rebound and drug resistance.

Results: 54 patients were randomly divided into 3 groups (17 patient - group DNA-4 0.25 mg, 17 patient - group DNA-4 0.5 mg, 20 patient - group placebo). All patients were immunized 4 times at days 0, 7,11,15 followed by 24 weeks follow-up period.

"DNA-4" was safe well tolerated for HIV infected people on HAART at doses 0.25 mg and 0.5 mg. There were no deaths or severe adverse effects detected during the study. Adverse affects were more pronounced at lower DNA concentrations. Neutropenia and leukopenia were detected in four vaccinated patients. Local reactions were detected in vaccinated groups and placebo group with the same frequency

The data suggest the possible influence of therapeutic DNA vaccination on viral reservoirs in some patients on HAART. This influence is associated with the reactivation of proviral genomes and / or the release of latent viral RNAs.

Conclusions: Further investigation and analysis all available data and clinical samples are required to find out if DNA vaccination (or repeated DNA vaccination) leads to HIV-1 eradication in patients on HAART.



УДК: 612.017.12

## РАЗРАБОТКА ВЫСОКОИММУНОГЕННОГО ПОЛИСАХАРИДНОГО КОНЪЮГИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ S. PNEUMONIAE СЕРОТИПА 9N

**Р.Нуриев, И.Гальвидис, Н.Ястребова, М.Буркин**

 ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный переулок, 5а,  
 Rinat1nuriev@gmail.com, +7(926)720-73-13

Получены конъюгаты капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 9N со столбнячным анатоксином. Изучено их взаимодействие со специфическими антителами, в результате подобран препарат с оптимальным соотношением полисахарида и белка-носителя. Исследование иммунологических свойств выбранного конъюгата выявило рост титра антител после двукратной иммунизации препаратом, адсорбированным на гидроксиде алюминия.

**Ключевые слова:** капсульный полисахарид; *S. pneumoniae*; гликоконъюгат; пневмококковая вакцина

В последние годы наблюдается феномен смены спектра циркулирующих серотипов *S. pneumoniae*, заключающийся в том, что возбудителями инвазивных инфекций все чаще становятся «невакцинные» серотипы. По данным эпидемиологических исследований, после начала применения 10- и 13-валентных вакцин в Европейском регионе, из всего числа зарегистрированных пневмококковых инвазивных инфекций у детей, 71,9% были вызваны «невакцинными» серотипами [1]. При этом, серотиповой пейзаж пневмококков значительно варьирует в зависимости от конкретного региона. В связи с этим совершенствование пневмококковых конъюгатных вакцин с учетом данных эпидемиологических исследований снова становится актуальным. Одним из распространенных на территории России невакцинных серотипов является *S. pneumoniae* серотипа 9N.

На основе капсульного полисахарида *S. pneumoniae* серотипа 9N (Пс9N), специфичных к данному антигену поликлональных антител [2] и моно- и поликлональных антител к столбнячному анатоксину (САТ) [3] разработаны методы количественного определения Пс9N (до 2,5 нг/мл) и САТ (до 10 нг/мл) в конкурентном и сэндвич-ИФА, а также сэндвич вариант для качественной оценки конъюгатов САТ-Пс9N. Конъюгаты САТ с Пс9N, модифицированным дигидразидом адипиновой кислоты, получены в реакции карбодиимидной конденсации при разных соотношениях компонентов. На основании данных иммунохимической оценки определен конъюгат с наиболее оптимальным составом. Низкая иммуногенность полученных препаратов, обнаруженная в предварительных экспериментах, обусловила необходимость использования адъюванта. Параметры сорбции САТ и Пс9N на гидроксиде алюминия были оптимизированы, и для проведения экспериментов *in vivo* использовалось соотношение конъюгата и адъюванта ( $\leq 1:1$ , w/w). Иммунизацию мышей конъюгатом САТ-Пс9N с массовым соотношением компонентов 3:4 (по 10 мкг/мышь в пересчете на полисахарид) проводили внутрибрюшинно. Исследование динамики антителопродукции и влияния адъюванта (100 мкг/мышь) на иммуногенность показало, что нарастание титра антител (до 1:70000) к Пс9N и САТ наблюдается уже после двукратной иммунизации мышей конъюгированным препаратом, адсорбированным на гидроксиде алюминия, по сравнению с контрольной группой ( $p < 0.01$ ). Для изучения протективных свойств вырабатываемых антител определяли титр бактериальной обсемененности легочной ткани иммунизированных мышей через 3, 24, 48 и 72 часа после интраназального заражения. Показано, что через 72 часа после заражения, титр бактериальной обсемененности в образцах легочной ткани иммунизированных конъюгатом мышей в 10 раз меньше по сравнению с титром бактериальной обсемененности легочной ткани мышей из контрольной группы ( $p > 0.05$ ).

В дальнейшем планируется разработка подобных конъюгированных вакцинных препаратов против других серотипов *S. pneumoniae*, распространенных на территории Российской Федерации, а также продолжение экспериментов по детальному изучению вырабатываемого в ответ на конъюгаты иммунного ответа.

*Литература:*

1. Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw M.H. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2017, 12(5): e0177113. 2. Нуриев Р.И., Гальвидис И.А., Ястребова Н.Е., Буркин М.А. Иммуноанализ капсульного полисахарида *Streptococcus pneumoniae* типа 9N для контроля компонентов вакцинных препаратов и диагностических целей. *Биотехнология: состояние и перспективы развития. Материалы IX международного конгресса*, 2017, т.2, 498-499. 3. Буркин М.А., Свиридов В.В., Перелыгина Е.В. Иммуноферментное определение столбнячного токсина и анатоксина с использованием моноклональных антител. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2004, 40(4): 478-484.

UDC 612.017.12

## THE DEVELOPMENT OF HIGHLY IMMUNOGENIC POLYSACCHARIDE CONJUGATE FOR PROTECTION AGAINST S. PNEUMONIAE TYPE 9N

R.Nuriev, I.Galvidis, N.Yastrebova, M.Burkin

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russia, 105064, Moscow, Malyj Kazionnyj per., 5a

The conjugates of *S. pneumoniae* type 9N capsular polysaccharide with tetanus toxoid were obtained. Basing on the immunochemical properties, we chose the conjugate with optimal ratio between polysaccharide and carrier protein. The immunological studies showed that two-fold immunization with chosen conjugate adsorbed on aluminum hydroxide significantly increases antibody titers.

**Key words:** capsular polysaccharide, *S.pneumoniae*; glycoconjugate; pneumococcal vaccine

Last years, the changes in the circulating *S. pneumoniae* serotypes were observed, which means that nonvaccine serotype strains began to emerge. According to the epidemiological studies, after the introduction of pneumococcal 10- and 13-valent conjugate vaccines in European region, 71,9% of all pneumococcal invasive diseases among children were caused by nonvaccine serotypes [1]. Furthermore, the serotype distribution significantly varies depending on the specific region. Hence, ongoing improvement of the conjugate vaccines in consideration with the epidemiological evidence is becoming relevant again. One of the commonest nonvaccine serotypes in the territory of the Russian Federation is *S. pneumoniae* type 9N.

Using *S. pneumoniae* type 9N capsular polysaccharide (Ps9N), specific to this antigen polyclonal antibodies [2] and mono- and polyclonal antibodies against tetanus toxoid (TTd) [3], we developed competitive and sandwich ELISA for quantitative determination of Ps9N (up to 2,5 ng/ml) and TTd (up to 10 ng/ml). Basing on this technique, we also developed sandwich ELISA for qualitative evaluation of TTd-Ps9N conjugates. These conjugates of TTd with Ps9N, modified with adipinic acid dihydrazide, were obtained using carbodiimide condensation method in different mass ratios between the components. Basing on the immunochemical evaluations, we chose a conjugate with optimal composition. Preliminary experiments revealed low immunogenicity of the conjugates, so we used an adjuvant. We studied absorption characteristics of TTd and Ps9N on aluminum hydroxide and identified optimal ratio ( $\leq 1:1$ , w/w) between conjugate and adjuvant for the in vivo experiments. Mice were immunized intraperitoneally with TTd-Ps9N conjugate (10  $\mu$ g Ps per animal) with 3:4 ratio between the components (w/w). Antibody production and adjuvant (100  $\mu$ g/mouse) influence on immunogenicity studies showed that antibody titers against Ps9N and TTd increased (up to 1:70000) after the second immunization with conjugate adsorbed on aluminum hydroxide ( $p < 0.01$ ). We also investigated the protectivity of generated antibodies. For this, immunized mice were inoculated intranasally with *S. pneumoniae* type 9N bacterial suspension. The microbiological examinations of infected mice lung tissues were conducted 3, 24, 48 and 72 hours after the inoculation. Bacterial contamination level in immunized mice lung tissues was 10-fold less than in non-immunized mice lung tissues 72 hours after the inoculation ( $p > 0.05$ ).

The further studies will include the development of conjugate vaccines against other *S. pneumoniae* serotypes widespread in the territory of the Russian Federation. The immunological response to conjugates will also be investigated more precisely.

### References:

1. Balsells E, Guillot L, Nair H, Kyaw M.H. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 2017, 12(5): e0177113.
2. Nuriev R.I., Galvidis I.A., Yastrebova N.E., Burkin M.A. Identification of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide type 9N in immunoassay for vaccine components control and diagnostics. IX International congress biotechnology: state of the art and perspectives. Congress proceedings 2017, part 2, 499.
3. Burkin M. A., Sviridov V. V., Perelygina O. V. Determination of tetanus toxin and toxoid by ELISA using monoclonal antibodies. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2004, 40(4): 409–414.

УДК 615.281.8, 615.371

## РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НА ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЯХ

**Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Федорова Е.А., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С.**

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия  
 197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7  
 e-mail: bogomolovaele@inbox.ru

Разработана вакцина против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8. Белок включает в себя высокоиммуногенные эпитопы капсидных белков ротавируса VP6 и VP8, а также фрагменты флагеллина *Salmonella* в качестве адъюванта. В доклинических исследованиях показана высокая иммуногенность, эффективность и безопасность разработанной вакцины.

**Ключевые слова:** вакцина; ротавирусный гастроэнтерит; рекомбинантный белок.

Ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младше 5 лет [1]. В результате перенесенной ротавирусной инфекции не происходит формирование стойкого иммунитета, в результате чего заболевание может повторяться в течение жизни. В силу отсутствия препаратов с прямым противоротавирусным действием самым эффективным способом борьбы с данным заболеванием является своевременная вакцинация. Лицензированные противоротавирусные вакцины основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека, что может приводить к развитию различных осложнений [2].

Активный агент кандидатной вакцины - белок FliCVP6VP8 - включает фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 ротавируса А, а также компоненты флагеллина *Salmonella typhimurium* FliC в качестве адъюванта, компоненты соединены гибкими мостиками. Представленные фрагменты являются консервативными частями белков VP6 и VP8, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфичные антитела. Данные антитела перекрестно реагируют с эпитопами различных штаммов ротавирусов А, В и С, гомологичными представленным фрагментам гибридного белка. Разработана лекарственная форма кандидатной вакцины, представляющая собой суспензию для внутримышечного введения, содержащую на одну дозу 20 мкг рекомбинантного белка FliCVP6VP8, а также 0,5 мг гидроксида алюминия в качестве адъюванта.

Проведены исследования эффективности разработанной кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на лабораторной модели ротавирусной инфекции. В качестве препарата сравнения была использована коммерческая вакцина Rotarix® (GSK). Значительное выделение ротавирусного антигена с фекалиями говорит об активном воспроизведении вируса в кишечнике животного. Выделение ротавирусного антигена с фекалиями дважды внутримышечно иммунизированных кандидатной вакциной и коммерческой вакциной Rotarix, и впоследствии зараженных ротавирусом EDC, животных было на одном уровне (менее 10 нг/мл). Протективный эффект кандидатной вакцины в отношении мышинного ротавируса ассоциировался с продукцией вирусспецифичных IgA и IgG в сыворотке крови и в кишечнике иммунизированных животных.

Проведены доклинические исследования безопасности разработанной кандидатной вакцины. Изучение острой токсичности и субхронической токсичности на половозрелых и неполовозрелых животных показало безопасность исследуемого препарата. Показано, что изученный препарат не оказывает негативного воздействия на генеративную функцию самцов и самок, а также не вызывает нарушений эмбрионального развития у потомства, полученного от скрещивания данных животных. Препарат не обладает потенциальной канцерогенной активностью.

Таким образом, разработана кандидатная вакцина против ротавирусной инфекции, активным агентом которой является рекомбинантный белок. Вакцина продемонстрировала эффективность, сравнимую с таковой коммерческой вакцины Rotarix. Кандидатная вакцина успешно прошла доклинические исследования безопасности, что говорит о перспективности разработанного препарата.

*Литература:*

1. WHO. Rotavirus vaccines WHO position paper. January 2013. № 5 (88). P. 49–64.
2. O’Ryan M. Rotavirus Vaccines: a story of success with challenges ahead // F1000Research. 2017. Vol. 6. P. 1517-1525.

UDC 615.281.8, 615.371

## DEVELOPMENT OF CANDIDATE VACCINE AGAINST ROTAVIRUS INFECTION AND STUDYING ITS EFFECACY ON LABORATORY MODEL

Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Fedorova E.A., Dukhovlinov I.V., Simbirtsev A.S.  
Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia  
197110, St. Petersburg, Pudozhskaya st., 7  
e-mail: bogomolovaele@inbox.ru

A vaccine against rotavirus infection based on the recombinant protein FliCVP6VP8 was developed. The protein includes highly immunogenic epitopes of capsid proteins of rotavirus VP6 and VP8, as well as fragments of flagellin Salmonella as an adjuvant. Preclinical studies show high immunogenicity, efficacy and safety of the developed vaccine.

**Key words:** vaccine; rotavirus gastroenteritis; recombinant protein.

Rotaviruses are the most frequent cause of enteritis. This infection often leads to severe dehydration of children under 5 years of age organism [1]. After rotavirus infection there is no formation of stable immunity, as a result of which the disease can be repeated throughout life. Due to the lack of drugs with direct action against rotaviruses, timely vaccination is considered the most effective way to prevent this disease. Licensed vaccines against rotavirus are based on alive attenuated rotavirus strains of human and / or animal origin that reproduce in the human intestine, which can result in different complications [2].

The FliCVP6VP8 protein is an active agent of the candidate vaccine. It includes a fragments of the VP6 and VP8 proteins of rotavirus A, as well as the flagellin FliC components of Salmonella typhimurium as an adjuvant. The components are connected by flexible bridges. These fragments are conserved parts of VP6 and VP8 proteins, to which specific antibodies are formed during the natural infection. These antibodies also cross-react with the epitopes of various strains of rotavirus A, B and C. The candidate vaccine is a suspension for intramuscular administration containing 20 µg of recombinant protein FliCVP6VP8 per dose, as well as 0.5 mg of aluminum hydroxide as an adjuvant.

The effectivity of the developed candidate vaccine against rotavirus infection on the laboratory model of rotavirus infection was studied. The commercial Rotarix® vaccine (GSK) was used as a comparison agent. The significant excretion of rotavirus antigen with feces suggests active reproduction of the virus in the intestine of the animal. Excretion of rotavirus antigen with feces twice intramuscularly immunized with candidate vaccine and commercial Rotarix vaccine, and subsequently infected with EDC rotavirus, animals was at the same level (less than 10 ng / ml). The protective effect of the candidate vaccine against murine rotavirus was associated with the production of virus-specific IgA and IgG in serum and in the intestine of immunized animals.

Preclinical safety studies of the developed candidate vaccine were conducted. The study of acute toxicity and subchronic toxicity in sexually mature and immature animals showed the safety of the vaccine. It is shown that the studied vaccine does not negatively affect the generative function of males and females, nor does it cause embryonic developmental disorders in offspring obtained from crossing these animals. The vaccine does not have potential carcinogenic activity.

Thus, a candidate vaccine against rotavirus infection based on recombinant protein was developed. The vaccine has demonstrated efficacy comparable to that of the commercial vaccine Rotarix. Candidate vaccine successfully passed preclinical safety studies, which indicates the promise of the developed drug.

### References:

1. WHO. Rotavirus vaccines WHO position paper. January 2013. No. 5 (88). P. 49-64.
2. O’Ryan M. Rotavirus Vaccines: a story of success with challenges ahead // F1000Research. 2017. Vol. 6. P. 1517-1525.

УДК 615.375

## РАЗРАБОТКА КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЁЗА И ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ НА ЛАБОРАТОРНЫХ МОДЕЛЯХ

**Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А.**

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

В модели генерализованного туберкулеза на лабораторных животных исследована кандидатная вакцина на основе белка TB10.4 *M.tuberculosis*, в одном из вариантов ее вводили совместно с адъювантом CRM197, либо IL-7. Продемонстрирована протективность по показателям тяжести течения туберкулеза, а также выживаемости мышей.

**Ключевые слова:** кандидатная вакцина; туберкулез; TB10.4; CRM197; IL-7.

Туберкулез является проблемой, которая наносит вред как на макроуровне - экономике стран и мира, так и на микроуровне - жизни человека и его семьи, окружения, забирая месяцы полноценной жизни и унося миллионы жизней ежегодно. В мировом сообществе поставлена цель на преодоление данного заболевания человечеством в обозримом будущем, и одной из основополагающих задач является создание эффективной противотуберкулезной вакцины.

Белок TB10.4 распознается на ранней стадии туберкулезной инфекции и способствует пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию ИФН- $\gamma$  - основного фактора протективного иммунитета. Он высоко консервативен среди различных штаммов микобактерий, а также способен вызывать иммунный ответ [1]. Важно, что он не имеет гомологии с известными белками других организмов, что обеспечивает также специфичность его действия. Ген *tb10.4* также представлен в геноме вакцинного штамма BCG [2].

Целью исследования было оценить иммуногенность кандидатной вакцины против туберкулеза на основе белка TB10.4 *M.tuberculosis*, в том числе при использовании совместно с адъювантами CRM197, либо IL-7.

Осуществляли двукратную, с интервалом в две недели, иммунизацию животных. Исследования проводили на самках белых мышей неинбредных линий, весом 18-20 г, возраст 6-8 недель (Питомник лабораторных животных «Рапполово»). Белок CRM197 вводили в составе композиции с TB10.4, а IL-7 вводили подкожно 7-кратно до первой иммунизации. Каждая из данных кандидатных вакцин содержала гидроксид алюминия, в качестве растворителя использовали физиологический раствор. Одна доза кандидатной вакцины содержала 20 мкг белка в объеме 200 мкл: либо 20 мкг TB10.4, либо 10 мкг TB10.4 и 10 мкг CRM197. Через две недели после второй иммунизации осуществляли заражение в хвостовую вену штаммом *M.tuberculosis* Erdman, не обладающим лекарственной устойчивостью. Через 6 недель после заражения животных умерщвляли, у них осуществляли забор легких и селезенки. Оценивали показатели контроля тяжести течения инфекционного процесса - коэффициенты массы легких (КМЛ), селезенки (КМС), индекс поражения легких (ИПЛ) и бактериологические показатели.

При иммунизации кандидатной вакциной на основе белка TB10.4 обнаружена задержка развития экспериментального туберкулеза, генерализованной формы, причем большая, чем при использовании BCG. Однако при использовании совместно с IL-7 или CRM197 она меньше. Кроме того, использование CRM197 по показателям КМЛ и ИПЛ (по КМС - также и IL-7) снижало эффективность кандидатной вакцины до меньшей, чем у BCG, а по КМС приводило к результату, худшему, чем в контроле заражения. По критериям выживаемости бактерий же использование вышеназванных адъювантов хоть и негативно действовало на эффективность исследованной кандидатной вакцины, но обеспечивало защиту большую, чем БЦЖ. Все исследованные варианты кандидатной вакцины обеспечили 100% выживаемость животных.

### Литература:

- Wayne L.G., Hayes L.G. An in vitro model for sequential study of shiftdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence // *Infect. Immun.* 1996. Vol. 64, № 6. P. 2062–2069.
- Kassa D. et al. Analysis of immune responses against a wide range of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with active pulmonary tuberculosis // *Clin. Vaccine Immunol.* CVI. 2012. Vol. 19, № 12. P. 1907–1915.

UDC 615.375

## THE DEVELOPMENT OF A CANDIDATE VACCINE AGAINST TUBERCULOSIS AND THE STUDY OF EFFECTIVENESS IN LABORATORY MODELS

**Fedorova E. A., Bogomolova E. G., Dobrovolskaya O. A.**

*Federal state unitary enterprise "State research Institute of highly pure biopreparations" of Federal medico-biological Agency, Saint-Petersburg, Russia  
197110 Russia, Saint-Petersburg, Pudozhskaya str., 7  
e-mail: science.eaf@yandex.ru*

In the model of generalized tuberculosis in laboratory animals a candidate vaccine was studied based on M. tuberculosis TB10.4 protein, in one embodiment, it was administered together with the adjuvant CRM197, or IL-7. Efficacy has been demonstrated in terms of severity of TB and survival of mice.

**Key words:** candidate vaccine; tuberculosis; TB10.4; CRM197; IL-7.

Tuberculosis is a problem that inflicts harm both on the macro level - the economy of the country and the world, and at the micro level – on a human life and life of his family, taking months of a full life and taking millions of lives annually. In the global community the goal of overcoming this disease of humanity in the foreseeable future has been set, a fundamental task is the creation of an effective TB vaccine.

Protein TB10.4 is detected at an early stage of tuberculous infection and promotes proliferation of lymphocytes responsible for the production of IFN- $\gamma$  which is a major factor in protective immunity. It is highly conserved among various strains of mycobacteria, and is also able to induce an immune response [1]. It is important that it has no homology with known proteins of other organisms that also ensures the specificity of its effect. Gene *tb10.4* is also represented in the genome of the BCG vaccine strain [2].

The aim of the study was to assess the immunogenicity of a candidate vaccine against tuberculosis based on TB10.4 protein of M. tuberculosis, also used together with adjuvants CRM197, or IL-7.

Animals were immunized twice, with an interval of two weeks. Studies were conducted on female white mice on neinbrucke lines, weighing 18-20 g, of age 6-8 weeks (Kennel of laboratory animals "Rappolovo"). The protein CRM197 was administered in the composition with TB10.4, and IL-7 was injected subcutaneously 7 times before the first immunization. Each of these candidate vaccines contains aluminium hydroxide, a saline is used as a solvent. One dose of the candidate vaccine contained 20  $\mu$ g of protein in a volume of 200  $\mu$ l: 20  $\mu$ g of TB10.4, or 10  $\mu$ g of TB10.4 and 10  $\mu$ g CRM197. Two weeks after the second immunization infection into the tail-vein was carried out by the M. tuberculosis Erdman strain, non-drug-resistant. 6 weeks after infection animals were killed, lungs and spleens were taken. Estimated indicators of the severity of the infectious process are the coefficients of the mass of the lungs (KML), spleen (KMS), an index of lung disease (ILD) and bacteriological indicators.

After immunization with the candidate vaccine based on the protein TB10.4 a delay was detected in development of experimental tuberculosis, a generalized form, and it was greater than when using BCG. However, when used together with IL-7 or CRM197 it was less. Furthermore, the use of CRM197 reduced the effectiveness of the candidate vaccine so that it became lower than that of BCG on KML and IPL indicators (KMS – IL-7), and on KMS led to a result worse than of the infection control. According to the criteria of survival of the bacteria and the use of the above-mentioned adjuvants, though they negatively acted on the effectiveness of the studied candidate vaccine, but provided its greater protection than BCG. All studied variants of a candidate vaccine provided 100% survival of animals.

### References:

1. Wayne L.G., Hayes L.G. An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence // *Infect. Immun.* 1996. Vol. 64, № 6. P. 2062–2069.
2. Kassa D. et al. Analysis of immune responses against a wide range of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with active pulmonary tuberculosis // *Clin. Vaccine Immunol. CVI.* 2012. Vol. 19, № 12. P. 1907–1915.

УДК 615.281.8, 615.371

## РАЗРАБОТКА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА СПЕЦИФИЧНОГО К БЕЛКУ P17 ВИЧ-1

Добровольская О.А., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Духовлинов И.В., Колмаков Н.Н., Луковенко А.А.

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.  
 197110, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7  
 e-mail: dobrovol'skay-oly@yandex.ru

Разработана технология получения рекомбинантного моноклонального антитела, специфичного к белку p17 ВИЧ-1 на основе высокопродуктивной линии клеток яичника китайского хомячка СНО-К1. Конструкция антитела содержит в своем составе домен, отвечающий за проникновение внутрь клеток, что позволит ему эффективно ингибировать репликацию вируса внутри инфицированных клеток.

**Ключевые слова:** ВИЧ, СПИД, вакцина, моноклональное антитело

Вирус иммунодефицита человека первого типа представляет собой возбудителя опасного инфекционного заболевания – синдрома приобретенного иммунодефицита человека. В настоящее время, когда число людей, инфицированных ВИЧ-1, в мире превысило 39 миллионов, возникла потребность в новых, доступных, нетоксичных терапевтических препаратах для борьбы с заболеванием, которое продолжает выходить из-под контроля, особенно в развивающихся странах [1].

Исследования последних лет показали, что матриксный белок p17 ВИЧ-1 является ключевым фактором иммунопатогенеза СПИДа, играющим важнейшую роль во всех этапах развития вируса и прогрессии заболевания. Связывание моноклональных антител против некоторых эпитопов белка p17 с поверхностью ВИЧ-1 инфицированных клеток приводит к уменьшению инфекционности вируса. Кроме этого, антитела к некоторым эпитопам матриксного белка обладают прямой вирус-нейтрализующей активностью, ингибируя инфицирование чувствительных клеточных линий после взаимодействия с вирионами [2].

Клинические исследования показали, что наличие высокого уровня антител к белку p17 коррелирует с медленным развитием СПИДа. Однако, частицы ВИЧ-1 на стадии созревания и уже созревшие, но остающиеся внутри клетки, не могут быть распознаны антителами, что снижает эффективность использования антител в терапевтических целях. Данная проблема может быть решена путем создания моноклонального антитела к белку p17 ВИЧ-1, обладающему нейтрализующим эффектом, а также способностью проникать внутрь клеток.

Нами разработана конструкция моноклонального антитела специфичного к белку p17 ВИЧ-1, содержащего в своем составе домен, отвечающий за проникновение внутрь клеток, синтезирующийся в виде одной последовательности с тяжелой цепью антитела.

Получен продуцент рекомбинантного моноклонального антитела на основе высокопродуктивной линии клеток яичника китайского хомячка СНО-К1, переведенных в суспензионное состояние и адаптированных к бессывороточной среде без компонентов животного происхождения. Трансфекцию клеток млекопитающих проводили методом кальций-фосфатного осаждения с двойной плазмидой, несущей устойчивость к генетическому накоплению целевого продукта, в культуральной жидкости линии-продуцента СНО-гМАТ осуществляли из одного селектированного клона, который по анализу методом ИФА показал стабильность продукции по меньшей мере в пяти пассажах.

Хроматографическую очистку рекомбинантного моноклонального антитела проводили в два этапа. После первого этапа очистки с использованием обратно-фазового сорбента С18 выход составил 250 мкг моноклонального антитела из 1 мл культуральной жидкости. На втором этапе, для доочистки моноклонального антитела, а также перевода его в фосфатную буферную систему, была использована методика разделения с помощью гель-фильтрации. В результате очистки был получен препарат на основе рекомбинантного моноклонального антитела, специфичного к белку p17 ВИЧ-1 с чистотой 98,5%.

В дальнейших исследованиях планируется проведение доклинических исследований полученного препарата, специфической фармакологической активности, острой, хронической и специфических видов токсичности и фармакокинетики.

### Литература:

1. WHO. HIV treatment and care. July 2017. WHO/HIV/2017.35
2. Fiorentini S, Giagulli C, Caccuri F, Magiera AK, Caruso A. HIV-1 matrix protein p17: a candidate antigen for therapeutic vaccines against AIDS // *Pharmacol Ther.* – 2010. – V. 128(3). – P. 433-44

UDC 615.281.8, 615.371

## DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC TO P17 HIV-1

**Dobrovolskaya O.A., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Dukhovlinov I.V., Kolmakov N.N., Lukovenko A.A.**

*Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia  
197110, St. Petersburg, Pudozhskaya st., 7  
e-mail: dobrovolskay-oly@yandex.ru*

A technology has been developed for the production of a recombinant monoclonal antibody specific for the HIV-1 p17 protein based on the highly productive Chinese hamster ovary cell line CHO-K1. The structure of the antibody contains a domain responsible for penetration into the cells, which will allow it to effectively inhibit the replication of the virus within the infected cells.

**Key words:** HIV, AIDS, vaccine, monoclonal antibody

The first type of human immunodeficiency virus is the causative agent of a dangerous infectious disease – the syndrome of acquired human immunodeficiency. At present, when the number of people infected with HIV-1 has exceeded 39 million worldwide, there is a need for new, affordable, non-toxic therapeutic drugs to fight the disease, which continues to get out of control, especially in developing countries [1].

Recent studies have shown that the matrix protein p17 HIV-1 is a key factor in the immunopathogenesis of AIDS, which plays a crucial role in all stages of the development of the virus and the progression of the disease. The binding of monoclonal antibodies against certain epitopes of the p17 protein to the surface of HIV-1 infected cells leads to a decrease in the infectivity of the virus. In addition, antibodies to some epitopes of the matrix protein have direct virus-neutralizing activity, inhibiting the infection of sensitive cell lines after interaction with the virions [2].

In clinical studies, it has been shown that a high level of antibodies to the p17 protein correlates with the slow development of AIDS. However, the HIV-1 particles at the maturity stage and already matured, but remaining inside the cell, can't be recognized by antibodies, which reduces the effectiveness of using antibodies for therapeutic purposes. This problem can be solved by creating a monoclonal antibody to the HIV-1 p17 protein, which has a neutralizing effect, as well as the ability to penetrate into the cells.

We developed the design of a monoclonal antibody of the HIV-1 specific protein p17, containing in its composition the domain responsible for the penetration of cells inside, synthesized as one sequence with a heavy chain antibody.

We obtained a producer of recombinant monoclonal antibody based on the highly productive Chinese hamster ovary cell line CHO-K1, translated into a suspension state and adapted to a serum-free medium without components of animal origin. Transfection of mammalian cells was performed by calcium phosphate precipitation with a double plasmid carrying resistance to genetinin. Accumulation of the product in the culture liquid of the CHO-rMAT production line was performed from one selected clone, which, according to ELISA analysis, showed product stability in at least five passages.

Chromatographic purification of the recombinant monoclonal antibody was carried out in two steps. After the first purification step using the C18 reverse phase sorbent, the yield was 250 µg of the monoclonal antibody from 1 ml of the culture liquid. In the second stage, for the additional purification of the monoclonal antibody, and also for its transfer to the phosphate buffer system, a separation technique was used by gel filtration. As a result of purification, a preparation of a recombinant monoclonal antibody specific for the HIV-1 p17 protein with a purity of 98.5% was obtained.

In further studies, it is planned to conduct preclinical studies of the preparation of a recombinant monoclonal antibody specific for the HIV-1 p17 protein, specific pharmacological activity, acute, chronic and specific types of toxicity and pharmacokinetics.

### References:

1. WHO. HIV treatment and care. July 2017. WHO/HIV/2017.35
2. Fiorentini S, Giagulli C, Caccuri F, Magiera AK, Caruso A. HIV-1 matrix protein p17: a candidate antigen for therapeutic vaccines against AIDS // *Pharmacol Ther.* – 2010. – V. 128(3). – P. 433-44



УДК 604.4:577.18; 606:615.281

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПОЛУЧЕНИЯ УНИВЕРСАЛЬНОЙ БЕТА-ЛАКТАМНОЙ ПЛАТФОРМЫ

Панин Н.В., Дробот В.В., Никулин М.В., Тюрин Е.С., Швядас В.Ю.К.

Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова  
 НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского  
 119992, Россия, Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр.40  
 panin@belozersky.msu.ru

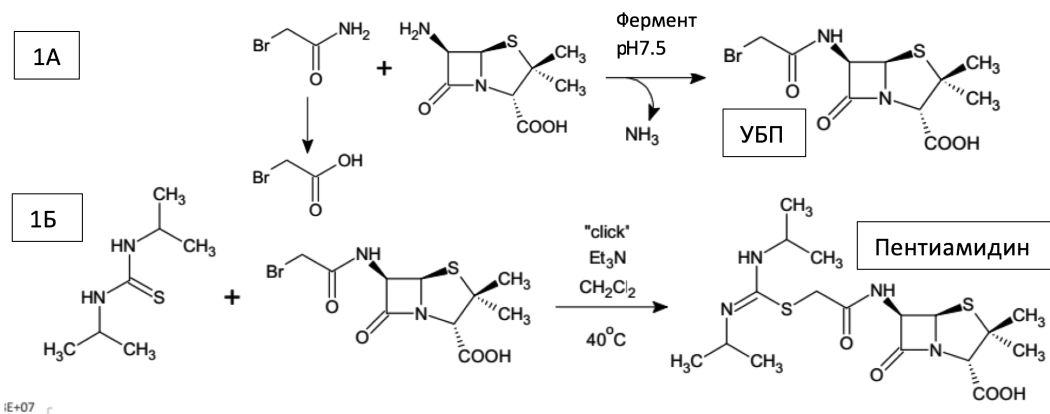
Ферментативное бромацилирование - новый инструмент для создания библиотек бета-лактамных антибиотиков. Изучены кинетические закономерности реакции синтеза универсальной бета-лактамной платформы (УБП) с помощью пенициллинацилаз из различных источников. Получен новый потенциальный антибиотик Пентиамидин.

**Ключевые слова:** ферментативный синтез антибиотиков, кинетика и катализ, клик-химия, рациональный дизайн ферментов, направленный мутагенез, новые бета-лактамные антибиотики.

Основную долю рынка антибактериальных препаратов занимают бета-лактамные антибиотики, к преимуществам которых можно отнести высокую клиническую эффективность и низкую токсичность. Однако, проблемы, связанные с резистентностью микроорганизмов к данному классу соединений, существенно ограничивают применение их в современном здравоохранении. Эти проблемы преодолеваются в основном введением различных N-ацильных заместителей, связанных ковалентно с бета-лактамным ядром. Успешность поиска и дизайна эффективных полусинтетических аналогов напрямую связана с доступностью, быстротой и легкостью введения нового N-ацильного радикала. В настоящее время наряду с агрессивным многостадийным химическим синтезом развиваются двустадийные химико-энзиматические методы введения широкого спектра ацильных групп, где на первой стадии ядро антибиотика ацилируется эфиром или амидом бромуксусной кислоты с помощью фермента пенициллинацилазы (рис.1А), что обеспечивает экономичность, экологичность и безопасность технологии. Такое N-бромацилированное ядро является универсальной бета-лактамной платформой (УБП) для последующей химической конденсации с производными тиомочевины по принципу клик-химии (Рис.1Б), что обеспечивает возможность получения широкого спектра потенциальных антибактериальных препаратов как в лабораторных, так и в промышленных условиях. Примером антибиотика, который можно получить с помощью данного подхода, является Цефатиамидин, представленный на китайском фармацевтическом рынке [1].

Главной проблемой предлагаемого подхода является снижение выхода ферментативного синтеза УБП за счет протекания в системе непродуктивного гидролиза бромацильного донора. Ранее на примере синтеза ампициллина нами была показана возможность преодоления проблемы за счет рационального дизайна биокатализатора. Так, с помощью молекулярного моделирования была предсказана мутация bF256R, при введении которой удалось увеличить эффективность синтеза ампициллина в 6 раз [2].

Целью данной работы является разработка эффективных биокатализаторов для проведения первой ферментативной стадии процесса - синтеза УБП. На данном этапе были решены следующие задачи: изучены кинетические закономерности реакции синтеза УБП с помощью пенициллинацилазы E.Coli; установлен механизм обнаруженной инактивации фермента галогенацильными радикалами; проверена эффективность доступных мутантов и штаммов пенициллинацилаз для синтеза УБП; проведена параметризация бета-лактамного ядра и подготовлена почва для рационального дизайна фермента. Для апробации предлагаемого подхода была дополнительно проведена конденсация УБП (ядро пенициллина G) с диизопропилтиомочевинной, в результате чего получен новый потенциальный антибиотик Пентиамидин (Рис.1Б).



Литература:

- [1] Zhang et al. *Penicillin acylase-catalyzed synthesis of N-bromoacetyl-7-aminocephalosporanic acid, the key intermediate for the production of cefathiamidine* *Bioresour. Bioprocess.* (2016) 3:49  
 [2] Панин Н.В. *Направленный мутагенез пенициллинацилазы из Escherichia coli для изменения каталитических свойств и стабильности.* Автореф.дисс.канд.хим.наук. - М, 2014 – С.10

UDC 604.4: 577.18; 606: 615.281

## ENZYMATIC SYNTHESIS OF UNIVERSAL BETA-LACTAM PLATFORM DEVELOPMENT

Panin N.V., Drobot V.V., Nikulin M.V., Tyurin E.S., Svedas V.Y.K.

M.V.Lomonosov Moscow State University  
 A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology  
 119992, Russia, Moscow, ul. Leninskie Gory, 1, str.40  
 panin@belozersky.msu.ru

Enzymatic bromacylation is a new tool for creating libraries of beta-lactam antibiotics. The kinetic regularities of the universal beta-lactam platform (UBP) synthesis with the help of penicillin acylases from various sources have been studied. A new potential antibiotic Penthiamidine has been obtained.

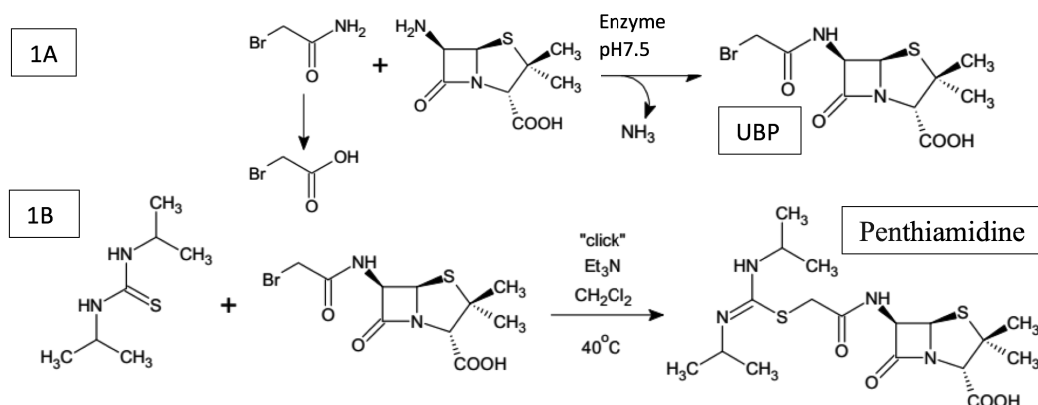
Keywords: enzymatic synthesis of antibiotics, kinetics and catalysis, click-chemistry, rational enzyme design, directed mutagenesis, new beta-lactam antibiotics.

The main share of the market for antibacterial drugs is occupied by beta-lactam antibiotics, to the advantages of which it is possible to attribute high clinical efficacy and low toxicity. However, the problems associated with the resistance of microorganisms to this class of compounds significantly limit their use in modern health care. These problems are overcome mainly by the introduction of various N-acyl substituents covalently linked to the beta-lactam nucleus. The success of the search and design of effective semisynthetic analogs is directly related to the availability, speed and ease of administration of the new N-acyl radical. At present, along with aggressive multi-stage chemical synthesis, two-stage chemical-enzymatic methods for the introduction of a wide range of acyl groups develop, where in the first stage the antibiotic core is acylated with an ester or amide of bromoacetic acid by the enzyme penicillinacylase (Fig. 1A), which ensures economy, environmental friendliness and safety technologies. This N-bromoacylated nucleus is a universal beta-lactam platform (UBP) for subsequent chemical condensation with thiourea derivatives according to the principle of click chemistry (Fig. 1B), which provides an opportunity to obtain a wide range of potential antibacterial drugs both in laboratory and in industrial conditions. An example of an antibiotic that can be obtained with this approach is Cefathiamidine, presented in the Chinese pharmaceutical market [1].

The main problem of the proposed approach is a decrease in the yield of enzymatic synthesis of UBPs due to the occurrence in the system of the bromacyl donor unproductive hydrolysis. Earlier, using the example of ampicillin synthesis, we demonstrated the possibility of overcoming the problem by rational design of the biocatalyst. So, with the help of molecular modeling, the mutation bF256R was predicted, with the introduction of which it was possible to increase the efficiency of ampicillin synthesis by 6 times [2].

The purpose of this work is the development of effective biocatalysts for the first enzymatic stage of the process

- the synthesis of UBP. At this stage, the following problems were solved: the kinetic regularities of the reaction of UBP synthesis with *E. coli* penicillin acylase were studied; the mechanism of the enzyme inactivation by haloacyl radicals was established; the efficacy of available mutants and strains of penicillin acylases for the synthesis of UBP was tested; parametrization of the beta-lactam nucleus was carried out and soil for rational design of the enzyme was prepared. To approbate the proposed approach, condensation of the UBP (nucleus of penicillin G) with diisopropylthiourea was additionally carried out, resulting in a new potential antibiotic Penthamidine (Fig. 1B).



References:

- [1] Zhang et al. Penicillin acylase-catalyzed synthesis of N-bromoacetyl-7-aminocephalosporanic acid, the key intermediate for the production of cefathiamidine *Bioresour. Bioprocess.* (2016) 3:49  
 [2] Panin N.V. Directed mutagenesis of penicillin acylase from *Escherichia coli* to change catalytic properties and stability. Author's abstract of the Candidate of Science. - M, 2014 - P.10

УДК: 571.27, ББК: 30.16

## РАСТИТЕЛЬНАЯ ПЛАТФОРМА ПРОДУКЦИИ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.В.Шешукова

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Россия, 119991, Москва, Губкина, 3, [ekaterina.sheshukova@gmail.com](mailto:ekaterina.sheshukova@gmail.com), +79260747625

Мы разработали растительную платформу продукции биспецифических антител (РБП-РБТ) для лечения рака молочной железы, содержащих вариабельные части растительного биосимиляра пертузумаба (РБП) и трастузумаба (РБТ). Исследование биологической активности биспецифических антител РБП-РБТ свидетельствует об их высокой способности ингибировать пролиферативную активность HER2-позитивных раковых клеток.

**Ключевые слова:** биспецифическое антитело, растение, вирусный вектор, трастузумаб, пертузумаб

Подавляющее большинство из более чем 40 используемых в клинике терапевтических моноклональных антител (ТМА) – это химерные (мышь/человек) или гуманизированные мышьиные антитела, принадлежащие к подклассу IgG1 [1]. Производство ТМА в клеточных системах млекопитающих несет потенциальные риски безопасности конечного продукта, обусловленные загрязнением ТМА клеточными продуктами, вирусами млекопитающих или ДНК млекопитающих с онкогенной активностью. Растительная клетка имеет сходные с животной клеткой механизмы экспрессии белка и его посттрансляционной модификации, включая гликозилирование, поэтому пригодна для продукции белков животных и человека при отсутствии рисков загрязнения животными продуктами. Более того, продукция антител в трансгенных растениях *N. benthamiana*ΔXTFTc нокаутированными генами β1,2- xylose-transferase (ΔXT) и α1,3-fucose-transferase (ΔFT) позволяет модифицировать углеводный состав Asn297-связанного гликана и, тем самым, повысить ингибирующую активность растительных антител [2,3].

Здесь мы описываем разработанную нами растительную платформу продукции биспецифических антител для лечения HER2-позитивного рака молочной железы и содержащих вариабельные части растительного биосимиляра пертузумаба (РБП) и трастузумаба (РБТ). Система накопления биспецифических

антител РБП-РБТ в растениях *Nicotianabenthamiana* основана на временной экспрессии целевого гена в растении, при которой суспензию бактерий *Agrobacterium tumefaciens* вводят в межклеточное пространство листа. Агробактериальный перенос генов, включая гены, кодирующие легкую и тяжелую цепи антитела, из бактерий в клетки растений происходит с помощью специально сконструированных бинарных векторов на основе генома растительных вирусов, вируса табачной мозаики и X-вируса картофеля. Разработанная нами векторная система позволяет накапливать, выделять и очищать значительное количество биспецифических антител РБП-РБТ как в растениях *N.benthamiana* дикого типа, так и в трансгенных растениях *N.benthamiana*ΔXTFT. Мы оценили эффективность подавления роста HER2-позитивных раковых клеток BT474, используя МТТ-тест. В соответствии с нашими ожиданиями биспецифические антитела РБП-РБТ ингибировали пролиферацию клеток BT474. Однако, что очень важно, антираковый эффект РБП-РБТ резко возрастал, если они были получены в трансгенных растениях ΔXTFT. Таким образом, удаление ксиллозы и фукозы в Asn297-связанном гликане константной части антитела резко повышает антираковую активность биспецифических антител РБП-РБТ.

Мы заключили, что разработанная нами растительная платформа позволяет получать эффективные биспецифические антитела РБП-РБТ для лечения рака молочной железы.

#### Литература:

1. Дорохов Ю.Л., Шешукова Е.В., Кособокова Е.Н., Шиндяпина А.В., Косоруков В.С., Комарова Т.В. Роль углеводных остатков в функционировании иммуноглобулина G человека и терапевтических моноклональных антител//Биохимия. 2016. Т. 81, Вып. 8. С. 1069-1090. 2. Комарова Т.В., Шешукова Е.В., Кособокова Е.Н., Серебрякова М.В., Косоруков В.С., Ташлицкий В.Н., Дорохов Ю.Л. Растительные биосимиляры пертузумаба и трастузумаба: модификация Asn297-связанного гликана антител, продуцированных в растении с нокаутом генов фукозил- и ксилотрансферазы//Биохимия. 2017. Т. 82. Вып. 4. С. 687-699. 3. Шешукова Е.В., Комарова Т.В., Дорохов Ю.Л. Растительная фабрика продукции моноклональных антител//Биохимия. 2016. Т. 81. Вып. 10. С. 1392-1409.

**Финансирование:** Работа была выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда в рамках проекта №16-14-00002.

UDC 571.27, BBC 30.16

## PLANT PLATFORM OF PRODUCTION OF BISPECIFIC ANTIBODIES FOR TREATMENT OF BREAST CANCER

E. Sheshukova

Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Russia, 119333, Moscow, Gubkina, 3

We developed a plant platform for the production of bispecific antibodies (PBP-PBT) for the treatment of breast cancer containing the variable parts of the plant biosimilar of pertuzumab (PBP) and trastuzumab (PBT). The study of the biological activity of bispecific antibodies PBP-PBT revealed their high ability to inhibit the proliferative activity of HER2-positive cancer cells.

**Key words:** bispecific antibody, plant, viral vector, trastuzumab, pertuzumab

The majority of more than 40 therapeutic monoclonal antibodies (TMA) used in clinical practice are chimeric (mouse/human) or humanized murine antibodies that belong to subclass IgG1 [1]. TMA production in mammalian cell systems poses potential safety risks to the product, which are related to contamination of the TMA with cellular components, mammalian viruses, or DNA having oncogenic activity. Plant cells have protein expression and posttranslational modification mechanisms similar to those of animal cells (including glycosylation); therefore, plant cells are suitable for production of proteins of human and animal origin in the absence of risks of animal products contamination. Moreover, the production of antibodies in transgenic ΔXTFT *N. benthamiana* plants with a double knockout of genes of α1,3-fucosyltransferase (FT) and β1,2-xylosyltransferase (XT) allows to modify the carbohydrate composition of Asn297-linked glycan and, thus, to improve the inhibitory activity of plant antibodies [2,3].

Here, we describe the plant platform that we have developed for the production of bispecific antibodies for the treatment of HER2-positive breast cancer and containing the variable parts of pertuzumab (PPB) and trastuzumab (TPB) plant biosimilars. System of PPB-TPB accumulation in a plant is based on the transient expression, when a suspension of *Agrobacterium tumefaciens* is injected into the leaf intercellular space. Agrobacterial transfer of genes from bacteria into plant cells, including those encoding the light and heavy chains of the antibody, is

mediated by a special binary vectors based on plant viruses genome - Tobacco mosaic virus and Potato virus X. Our vector system allows accumulating, isolating and purifying a significant amount of bispecific PPB-TPB antibodies in wild type *N. benthamiana* plants and transgenic  $\Delta$ XFTF *N. benthamiana* plants. We assessed the efficiency of HER2-positive cancer cells BT474 proliferation inhibition using the MTT test. In accordance with our expectations, PPB-TPB bispecific antibodies suppressed BT474 cells proliferation. Noteworthy, the anti-cancer effect of PPB-TPB increased dramatically if they were obtained in transgenic  $\Delta$ XFTF plants. Thus, the removal of xylose and fucose from the Asn297-linked glycan of the antibody's constant part dramatically increases the anti-cancer activity of bispecific PPB-TPB antibodies.

We concluded that our plant platform allows obtaining effective bispecific antibodies PPB-TPB for the treatment of breast cancer.

#### References:

1. Dorokhov Y.L., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N., Shindyapina A.V., Kosorukov V.S., Komarova T.V. *Functional Role of Carbohydrate Residues in Human Immunoglobulin G and Therapeutic Monoclonal Antibodies*//*Biochemistry (Moscow)*. 2016. Vol. 81. № 8. P. 835-857.
2. Komarova T.V., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N., Serebryakova M.V., Kosorukov V.S., Tashlitsky V.N., Dorokhov Y.L. *Trastuzumab and Pertuzumab Plant Biosimilars: Modification of Asn297-linked Glycan of the mAbs Produced in a Plant with Fucosyltransferase and Xylosyltransferase Gene Knockouts*//*Biochemistry (Moscow)*. 2017. Vol. 82. P. 510-520.
3. Sheshukova E.V., Komarova T.V., Dorokhov Y.L. *Plant Factories for the Production of Monoclonal Antibodies*//*Biochemistry (Moscow)*. 2016. Vol. 81. P. 1118-1135.

**Grant:** This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 16-14-00002).

УДК 615.074:614.7

## СОЧЕТАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В ГИБРИДНОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ ДЛЯ РАСШИРЕНИЯ СПЕКТРА ВЫЯВЛЯЕМЫХ СУЛЬФАНИЛАМИДОВ

Буркин М.А.<sup>1</sup>, Нуриев Р.И.<sup>1</sup>, Гальвидис И.А.<sup>1</sup>, Еремин С.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а.

<sup>2</sup> Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия 119991, Москва, Ленинские Горы, 1. e-mail: burma68@yandex.ru

На основе двух моноклональных антител с различной специфичностью в отношении сульфаниламидных препаратов разработан гибридный вариант иммуноферментного анализа, характеризующийся широкой специфичностью, объединяющей спектры распознавания индивидуальных антител.

**Ключевые слова:** гибридный иммуноанализ; групповая специфичность; сульфаниламиды;

Одновременное определение нескольких анализируемых соединений крайне актуально для разнообразных скрининговых исследований или диагностических мероприятий и в настоящее время реализуется посредством активно развивающихся методов иммунохимической мультidetекции. Групп-специфический иммуноанализ является разновидностью таких методов и позволяет регистрировать молекулы с близкой химической структурой. Тем не менее, индивидуальные различия в химическом строении отдельных аналитов ограничивают возможность выявления всего спектра соединений группы. В настоящей работе для преодоления этой проблемы предложен вариант гибридного анализа сульфаниламидов, объединяющий аналитические возможности двух групп-специфических моноклональных антител (МкАт) разного спектра распознавания и сконструированный по принципу одноэтапного конкурентного сэндвич-анализа. В качестве промежуточного бифункционального реагента синтезирован конъюгат МкАт №1-гаптен №2, который одновременно реагирует с гаптеном №1 и связывается МкАт №2. Оба типа взаимодействий могут подавляться свободными сульфаниламидами - аналогами как гаптена №1, так и гаптена №2 и, таким образом, оказывать влияние на результирующий сигнал реакции. При использовании реагента МкАт №1-гаптен №2 конкурентный сэндвич-ИФА может быть реализован в двух форматах - при иммобилизации конъюгированного антигена (белок-гаптен №1) или на иммобилизованных МкАт №2. В сравнительных исследованиях двух форматов гибридного анализа показатели чувствительности и специфичности оказались сходными, IC50 для асулама, сульфаметоксазола, этазола, сульфаметизола, норсульфазола, сульфанитрана, сульфапиридина, сульфалхлорпиридазина, сульфадиазина, сульфаметоксипиридазина, сульфадиметокси-

на, сульфамонетоксина, сульфамеразина, сульфаметазина и сульфахиноксалина не превышал 100 нг/мл. Таким образом, для выявления 15 указанных сульфаниламидных препаратов в исследуемых образцах оба формата могут быть пригодны в равной мере. Предложенный дизайн твердофазного иммуноферментного анализа позволяет сочетать несколько иммунохимических взаимодействий в едином гибридном тесте и, суммируя их аналитический потенциал, обеспечивать распознавание большего числа аналитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0198.

UDC 615.074:614.7

## MONOCLONAL ANTIBODIES COMBINING IN HYBRID ENZYME IMMUNOASSAY TO BROAD THE SPECTRUM OF DETECTABLE SULFONAMIDES

Burkin M.A.<sup>1</sup>, Nuriev R.I.<sup>1</sup>, Galvidis I.A.<sup>1</sup>, Eremin S.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> I.Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russia Malyj Kazionnyj per. 5a, Moscow, 105064, Russia;

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry, M.V.Lomonosov MSU, Russia Leninsky Gory, 1, Moscow, 119991, Russia; e-mail: burma68@yandex.ru

Two monoclonal antibodies with different specificities towards sulfonamides were used to develop hybrid type of enzyme-linked immunosorbent assay. It performed the broad specificity that combined the recognition spectra of individual antibodies.

Keywords: hybrid immunoassay; group specificity; sulfonamides;

The simultaneous determination of several analytes is rather advantageous for various screening or diagnostics procedures. It can be realized using methods of immunochemical multidetection which are actively developing at present. Group-specific immunoassay is a kind of such methods, it allows to detect structurally related molecules. Nevertheless, the features in the chemical structure of individual analytes restrict the capability to reveal a whole range of compounds of the group. In the present study, to overcome this problem, a variant of a hybrid assay of sulfonamides, combining the analytical potential of two group-specific monoclonal antibodies (McAb) with different recognition spectrum, is proposed. The hybrid assay is designed as one-step competitive sandwich-ELISA involving the intermediate bifunctional reagent, the synthesized conjugate McAb No.1-hapten No.2, which can simultaneously bind to hapten No.1 and be bound by McAb No.2. Both types of interactions can be inhibited by free sulfonamides, the analogs of both hapten No.1 and hapten No.2 and, thus, influence on the resulting optical signal. The synthesized McAb No.1-hapten No.2 allowed two formats of competitive sandwich ELISA to be realized: one with coating antigen (protein-hapten No.1), another with immobilized McAb No.2. Two formats of hybrid analysis were compared and the sensitivity and specificity characteristics were found to be similar. The IC50 values for asulam, sulfamethoxazole, sulfaethidole, sulfamethizole, sulfathiazole, sulfanitran, sulfapyridine, sulfachloropyridazine, sulfadiazine, sulfamethoxy-pyridazine, sulfadimethoxine, sulfamonomethoxine, sulfamerazine, sulfamethazine, and sulfaquinoxaline did not exceed 100 ng/ml. Thus, in order to detect the above mentioned 15 sulfonamides in the test samples, both formats can be equally suitable. The proposed design of immunosorbent assay allows to combine several immunochemical interactions in a single hybrid test and to sum up their analytical capacities to provide recognition of a greater number of analytes.

This investigation was financially supported by the Russian Ministry of Education and Science (contract 14.604.21.0198 from September 26, 2017; unique identifier of applied research: RFMEFI60417X0198).

УДК 577.29, 577.181.5

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЛЬФА-СПИРАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ ChMAP-28 И МЕЛИТТИНА

Емельянова А.А., Кузьмин Д.В., Пантелеев П.В., Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академик М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН  
 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10  
 e-mail: annaemelyan@gmail.com

На панели клеточных линий человека изучены цитотоксические свойства и механизм действия катионного  $\alpha$ -спирального антимикробного пептида ChMAP-28 в сравнении с пептидом пчелиного яда мелиттином.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды;  $\alpha$ -спиральные пептиды; цитотоксический эффект; противоопухолевая активность.

В работе изучена цитотоксическая активность кателицидина ChMAP-28, антимикробного пептида из лейкоцитов козы, обладающего высокой степенью гомологии с другими  $\alpha$ -спиральными кателицидинами млекопитающих. Исследование проведено в сравнении с пептидом мелиттином – основным компонентом пчелиного яда.

С помощью МТТ-теста показано, что ChMAP-28 проявлял значительно более высокую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеточным линиям в концентрации  $<10$  мкМ, чем к нормальным клеткам человека. Значения IC<sub>50</sub> для ChMAP-28 находились в диапазоне 3,4-6,5 мкМ для опухолевых клеточных линий, ~9 мкМ для эмбриональных фибробластов, для нормальных астроцитов человека 50%-ное ингибирование не достигалось даже при концентрации 10 мкМ. Значения IC<sub>50</sub> мелиттина находились в узком диапазоне 1-2 мкМ для всех клеточных линий, что говорит о неселективном действии. Концентрация ChMAP-28, вызывающая лизис 50% эритроцитов, определенная в данном исследовании (~100 мкМ), примерно в 20 раз выше, чем его IC<sub>50</sub> для опухолевых клеток. Мелиттин вызывал 50%-ный гемолиз в концентрации 1,5 мкМ.

Для проточной цитометрии клеток лейкоза HL-60 использовали ChMAP-28 в трех концентрациях:  $<IC_{50}$  (1 мкМ), сопоставимой с IC<sub>50</sub> (3 мкМ) и в два раза превышающей IC<sub>50</sub> (6 мкМ). Мелиттин использовался в качестве положительного контроля в концентрациях 1, 2 и 4 мкМ соответственно. Окрашивание FITC-Annexin V/PI показало, что эффект ChMAP-28 сильно зависит от концентрации, но не от времени инкубации. Напротив, при концентрации мелиттина 2 мкМ процент мертвых клеток увеличивался пропорционально времени инкубации.

Цитотоксический эффект обоих пептидов достигается предположительно за счет нарушения целостности цитоплазматической мембраны, что не отменяется добавлением ингибитора каспазы Z-VAD-FMK при концентрации пептидов  $2 \times IC_{50}$ .

После окрашивания трипановым синим выяснилось, что вызванная ChMAP-28 гибель клеток происходила в основном в течение первых 15 мин и не увеличивалась после 1 ч инкубации. Это более характерно для некроза. Напротив, для мелиттина доля мертвых клеток росла с течением времени. В совокупности с предыдущими, эти данные свидетельствуют о том, что ChMAP-28 вызывает некротическую, а не апоптотическую гибель клеток HL-60.

ChMAP-28 показал значительный потенциал в качестве предполагаемого противоопухолевого соединения, превосходящего мелиттин значительно большей селективностью и меньшей гемолитической активностью.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

UDC 577.29, 577.181.5

## COMPARATIVE STUDY OF THE CYTOTOXIC PROPERTIES OF ALPHA-HELICAL PEPTIDES CHMAP-28 AND MELITTIN

Emelianova A.A., Kuzmin D.V., Pantelev P.V., Ovchinnikova T.V.

M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia  
117997, Moscow, Miklukho-Maklaya Street, 16/10  
e-mail: annaemelyan@gmail.com

Cytotoxic properties and mechanism of action of cationic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide ChMAP-28 in comparison with bee venom peptide melittin were studied on the panel of human cancer and normal cell lines.

**Key words:** antimicrobial peptides;  $\alpha$ -helical peptides; cytotoxic effect; anticancer activity.

We studied cytotoxic activity of the cathelicidin antimicrobial peptide from the leucocytes of goat *Capra hircus* called ChMAP-28. The peptide is highly homologous to other  $\alpha$ -helical mammalian cathelicidins. The study was carried out in comparison with melittin – the main component of the bee venom.

The results of MTT-test demonstrated that ChMAP-28 showed considerably higher cytotoxicity in cultured tumor cells than in the normal cells at concentrations of  $<10 \mu\text{M}$ . IC<sub>50</sub> for ChMAP-28 was in the range of 3.4-6.5  $\mu\text{M}$  for cancer cell lines,  $\sim 9 \mu\text{M}$  for embryonic fibroblasts. For normal human astrocytes the 50% inhibition was not reached even at 10  $\mu\text{M}$  concentration. The melittin IC<sub>50</sub> varied in the narrow range of 1-2  $\mu\text{M}$  for all cell lines without any selectivity. The half-hemolysis concentration of ChMAP-28 ( $\sim 100 \mu\text{M}$ ) was  $\sim 20$  fold higher than its IC<sub>50</sub> for the cancer cell lines. Melittin caused 42% hemolysis at the concentration of 1.5  $\mu\text{M}$ .

Dead HL-60 leukemia cells counting was performed by flow cytometry. ChMAP-28 was used in at three concentrations:  $< \text{IC}_{50}$  (1  $\mu\text{M}$ ), comparable to IC<sub>50</sub> (3  $\mu\text{M}$ ) and two times higher than IC<sub>50</sub> (6  $\mu\text{M}$ ). Melittin was used as the positive cytotoxic control at the concentrations of 1, 2 and 4  $\mu\text{M}$ , respectively. FITC Annexin V/PI staining showed that the effect of ChMAP-28 depended highly on the concentration, but not on the incubation time. In contrast, for melittin at the concentration of 2  $\mu\text{M}$  the percentage of dead cells increased proportionally to incubation time

The cytotoxic effects of both peptides accomplished presumably due to disruption of plasma membrane integrity, which was not abrogated by the addition of caspase inhibitor Z-VAD-FMK at the  $2 \times \text{IC}_{50}$  peptide concentration.

After trypan blue staining it was figured out that the ChMAP-28-induced cell death occurred mostly during the first 15 min and did not rise after 1 h of incubation, which was more typical for necrotic cell death. In contrast, for melittin the proportion of dead cells was growing in both time- and concentration-dependent manners. Taken together with the previous data, these findings evidenced that ChMAP-28 induced necrotic, but not apoptotic death of HL-60 cells.

ChMAP-28 showed a considerable potential as the putative anticancer agent exceeding melittin by significantly higher selectivity and lower hemolytic activity.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 14-50-00131).

УДК 577.112; 577.18

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академик М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия  
117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; ovch@ibch.ru

В настоящее время сформировано представление об антимикробных пептидах (АМП) как о молекулярных факторах системы врожденного иммунитета, обеспечивающих универсальный способ защиты человека, животных и высших растений от инфекции. Доклад посвящен анализу терапевтического потенциала АМП и поиску путей создания антибиотиков нового поколения на их основе.

**Ключевые слова:** антимикробные пептиды, врожденный иммунитет, антибиотики



Антимикробные пептиды (АМП) относятся к числу наиболее значимых компонентов иммунной системы многоклеточных организмов. АМП животного происхождения – рибосомально синтезируемые молекулы, которые, как правило, обладают положительным зарядом и амфифильными свойствами. Они могут проявлять активность в отношении бактерий, мицелиальных и дрожжевых грибов, простейших, оболочечных вирусов [1]. Молекулярный механизм антибиотического действия АМП в большинстве случаев связан с нарушением целостности цитоплазматической мембраны. Наряду с обширными данными о мембранотропных свойствах АМП появляется все больше сведений о внутриклеточных мишенях их действия [2]. В частности, показано, что тахиплезин связывается с ДНК в области малой бороздки [3]. Связываясь с ДНК, АМП могут подавлять процессы репликации и транскрипции. Наряду с цитоплазматической мембраной и внутриклеточными мишенями некоторые АМП обладают сродством к компонентам клеточной стенки бактерий и грибов. Высказывается предположение, что антибиотическое действие этих АМП реализуется путем ингибирования биосинтеза клеточной стенки. Многие АМП, обладающие противогрибковой активностью, способны связываться с хитином [4]. Помимо инактивации микроорганизмов АМП как молекулярные факторы системы врожденного иммунитета участвуют в регуляции иммунных реакций организма. В частности, АМП обладают опсонизирующей микробы активностью [5], проявляют хемотаксическую активность в отношении макрофагов, нейтрофилов, незрелых дендритных клеток [6], вызывают дегрануляцию тучных клеток [7], модулируют дифференцировку дендритных клеток [8], участвуют в регуляции ангиогенеза [9], обладают кортикостатической активностью [10]. Поиск и исследование эндогенных защитных пептидов позволяет лучше понять закономерности функционирования врожденного иммунитета у млекопитающих и человека и дает ключ к разработке новых лекарственных средств. Разнообразие биологических функций АМП определяет их высокий терапевтический потенциал [11]. Структурные особенности различных АМП создают основу для разработки антибиотиков нового поколения, материалов, обладающих устойчивостью к формированию биопленок, средств для дезинфекции хирургических инструментов и катетеров, противораковых и противовирусных препаратов, иммуномодуляторов, противовоспалительных средств, ингибиторов экзотоксинов и протеаз, препаратов для лечения метаболических нарушений и анальгетиков. Кроме того, АМП могут быть использованы при лечении нейродегенеративных заболеваний, выступая в качестве блокаторов образования Аβ-фибрилл [12]. Благодаря своей способности увеличивать проницаемость бактериальных мембран АМП могут быть использованы в синергетической комбинации с обычными антибиотиками или друг с другом таким же образом, как это происходит в природе, что может лимитировать эволюцию антибиотикоустойчивых микроорганизмов, а также перекрестную резистентность к защитным пептидам человека [13].

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (соглашение № 14-50-00131).

#### Литература:

- Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. *Antimicrobial Peptides of Invertebrates. Part 1. Structure, Biosynthesis, and Evolution.* // *Russian J. Bioorg. Chem.* 2016. Vol. 42, № 3. P. 229–248.
- Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. *Antimicrobial Peptides of Invertebrates. Part 2. Biological Functions and Mechanisms of Action.* // *Russian J. Bioorg. Chem.* 2016. Vol. 42, № 4. P. 343–360.
- Yonezawa A., Kuwahara J., Fujii N., Sugiura Y. // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31. № 11. P. 2998–3004.
- Osaki T., Omotezako M., Nagayama R., Hirata M., Iwanaga S., Kasahara J., Hattori J., Ito I., Sugiyama H., Kawabata S.J. // *Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. № 37. P. 26172–26178.
- Fleischmann J., Selsted M., Lehrer R.I. // *Diagn. Microbiol. Dis.* 1985. Vol. 3. № 3. P. 233–242.
- Biragyn A., Surenhu M., Yang D., Ruffini P.A., Haines B.A., Klyushnenkova E., Oppenheim J.J., Kwak L.W. // *J. Immunol.* 2001. Vol. 167. № 11. P. 6644–6653.
- Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H., Nagaoka I. // *Eur. J. Immunol.* 2001. Vol. 31. № 4. P. 1066–1075.
- Davidson D.J., Currie A.J., Reid G.S., Bowdish D.M., Mac-Donald K.L., Ma R.C., Hancock R.E., Speert D.P. // *Immunol.* 2004. Vol. 172. № 2. P. 1146–1156.
- Li J., Post M., Volk R., Gao Y., Li M., Metais C., Sato K., Tsai J., Aird W., Rosenberg R., et al. // *Nat. Med.* 2000. Vol. 6. № 1. P. 49–55.
- Zhu Q.Z., Hu J., Mulay S., Esch F., Shimasaki S., Solomon S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. № 2. P. 592–596.
- Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. *Structure and biological functions of β-hairpin antimicrobial peptides.* // *Acta Naturae.* 2015. Vol. 7. № 1(24). P. 37–47.
- Yamin, G.; Ruchala, P.; Teplow, D.B. *A peptide hairpin inhibitor of amyloid β-protein oligomerization and fibrillogenesis.* // *Biochemistry.* 2009. Vol. 48. № 48. P. 11329–11331.
- Panteleev P.V., Balandin S.V., Ivanov V.T., Ovchinnikova T.V. *A therapeutic potential of animal β-hairpin antimicrobial peptides.* // *Current Med. Chem.* 2017. Vol. 24. № 17. P. 1724–1746.

UDK 577.112; 577.18

## STRUCTURAL PECULARITIES, BIOLOGICAL FUNCTIONS AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Ovchinnikova T.V.

M.M.Shemyakin & Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10; ovch@ibch.ru

Antimicrobial peptides (AMPs) as molecular factors of the innate immunity system provide a universal way of protecting humans, animals and higher plants from infection. The report is devoted to the analysis of the therapeutic potential of AMPs and prospects for development of novel antibiotics based on them.

**Key words:** antimicrobial peptides, innate immunity, antibiotics

Antimicrobial peptides and proteins (AMPs) are among the most important components of the immune system of multicellular organisms. The AMPs of animal origin are ribosomally synthesized molecules that have, as a rule, a positive net charge and amphiphilic properties. They can act against bacteria, yeast and filamentous fungi, protozoa, and enveloped viruses [1]. The molecular mechanism of the antibiotic action of AMPs in most cases involves a disruption of the cytoplasmic membrane. Along with the extensive data on the membranotropic properties of AMPs there has been an increasing number of reports on their intracellular targets [2]. In particular, tachyplesin was shown to bind to DNA in the minor groove [3]. When binding to DNA, AMPs can inhibit the replication and transcription processes. Aside from the cytoplasmic membrane and intracellular targets, some AMPs exhibit affinity to the components of bacterial and fungal cell walls. The antibiotic action of such AMPs is thought to be ensured through the inhibition of cell wall biosynthesis. Many AMPs that exhibit antifungal activity are capable of binding to chitin [4]. Besides the inactivation of microorganisms, AMPs as molecular factors of the innate immune system participate in the regulation of immune reactions. In particular, AMPs possess the ability to opsonize microbes [5]; exhibit chemotactic activity against macrophages, neutrophils, and immature dendritic cells [6]; cause the degranulation of mast cells [7]; modulate dendritic cell differentiation [8]; and they are also involved in the regulation of angiogenesis [9] and possess corticostatic activity [10].

The search and study of endogenous host defense peptides give molecular insight into innate immunity in mammals and humans and provides the key to development of new medicines. A variety of biological functions of AMPs determines their high therapeutic potential [11]. Structural features of different AMPs and their diverse biological functions provide the basis for development of systemic and topical antibiotics, biofilm-resistant materials, agents for disinfecting surgical instruments and catheters, anticancer and antiviral drugs, immunomodulators, anti-inflammatory agents, exotoxin and protease inhibitors, drugs for treatment of metabolic disorders, and analgesics. Furthermore, AMPs may be used in the treatment of neurodegenerative diseases, acting as blockers of A $\beta$ -fibril formation [12]. As factors increasing permeability of bacterial membranes, AMPs may be used in synergistic combination with conventional antibiotics and other protective peptides, in the same way as it occurs in nature that could limit evolution of resistance as well as cross-resistance to human defense peptides [13].

The work is supported by the Russian Science Foundation (the agreement No. 14-50-00131).

### References:

1. Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. *Antimicrobial Peptides of Invertebrates. Part 1. Structure, Biosynthesis, and Evolution.* // *Russian J. Bioorg. Chem.* 2016. Vol. 42, № 3. P. 229–248.
2. Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. *Antimicrobial Peptides of Invertebrates. Part 2. Biological Functions and Mechanisms of Action.* // *Russian J. Bioorg. Chem.* 2016. Vol. 42, № 4. P. 343–360.
3. Yonezawa A., Kuwahara J., Fujii N., Sugiura Y. // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31. № 11. P. 2998–3004.
4. Osaki T., Omotezako M., Nagayama R., Hirata M., Iwanaga S., Kasahara J., Hattori J., Ito I., Sugiyama H., Kawabata S.J. // *Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. № 37. P. 26172–26178.
5. Fleischmann J., Selsted M., Lehrer R.I. // *Diagn. Microbiol. Dis.* 1985. Vol. 3. № 3. P. 233–242.
6. Biragyn A., Surenhu M., Yang D., Ruffini P.A., Haines B.A., Klyushnenkova E., Oppenheim J.J., Kwak L.W. // *J. Immunol.* 2001. Vol. 167. № 11. P. 6644–6653.
7. Niyonsaba F., Someya A., Hirata M., Ogawa H., Nagaoka I. // *Eur. J. Immunol.* 2001. Vol. 31. № 4. P. 1066–1075.
8. Davidson D.J., Currie A.J., Reid G.S., Bowdish D.M., Mac-Donald K.L., Ma R.C., Hancock R.E., Speert D.P. // *Immunol.* 2004. Vol. 172. № 2. P. 1146–1156.
9. Li J., Post M., Volk R., Gao Y., Li M., Metais C., Sato K., Tsai J., Aird W., Rosenberg R., et al. // *Nat. Med.* 2000. Vol. 6. № 1. P. 49–55.
10. Zhu Q.Z., Hu J., Mulay S., Esch F., Shimasaki S., Solomon S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. № 2. P.

592–596.

11. Panteleev P.V., Bolosov I.A., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V. Structure and biological functions of  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptides. // *Acta Naturae*. 2015. Vol. 7. № 1(24). P. 37-47.

12. Yamin, G.; Ruchala, P.; Teplow, D.B. A peptide hairpin inhibitor of amyloid  $\beta$ -protein oligomerization and fibrillogenesis. // *Biochemistry*. 2009. Vol. 48. № 48. P. 11329-11331.

13. Panteleev P.V., Balandin S.V., Ivanov V.T., Ovchinnikova T.V. A therapeutic potential of animal  $\beta$ -hairpin antimicrobial peptides. // *Current Med. Chem*. 2017. Vol. 24. № 17. P. 1724-1746.

УДК: 579.65

## ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* 20 КАК ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ШТАММОВ.

П.Д.Осипова<sup>1</sup>, Д.С.Карпов<sup>2</sup>, А.И.Домашин<sup>3</sup>, С.В.Киселева<sup>4</sup>, Е.С.Челарская<sup>2</sup>, М.И.Котлов<sup>2</sup>, А.А.Гуридов<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов, Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо - Маклая, д. 10 к.2., osipova.pamila@yandex.ru, 89168898810

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН), Россия, 119991, Москва, улица Вавилова, 32, aleom@yandex.ru, 89262239200

<sup>3</sup> Институт медико-биологических проблем РАН (ИМБП РАН), Россия, 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А, domashin@mail.ru, +7(499)1953020

<sup>4</sup> Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина, Россия, 109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23, sw.kiseleva@yandex.ru, 89168898810 katerina.chelarskaya@yandex.ru, 84953779332

Штаммы *Bacillus subtilis* имеют большое значение в ветеринарии, медицине и биотехнологической отрасли. В ходе исследований микробиома российского сегмента международной космической станции выделен штамм *B.subtilis*-20. Штамм обладает способностью к быстрому росту и накоплению большей биомассы по сравнению с земным штаммом *B.subtilis* 168, а, значит, может быть использован как платформа для создания новых штаммов-продуцентов.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, международная космическая станция, кинетика роста

Микроорганизмы - древнейшая из форм жизни на Земле. Они способны адаптироваться к различным экстремальным условиям и поэтому могут быть обнаружены в самых неожиданных местах нашей планеты. Несмотря на все меры предосторожности и повышенные требования к санитарной чистоте микробы проникают и на космические летательные аппараты, включая космические станции. Источниками микробов могут служить аутомикрофлора космонавтов, полимерные материалы, подверженные заселению микробами, а также грузы доставляемые на космическую станцию [1, 2]. На орбите космической станции ослаблено действие факторов, защищающих земные организмы от космических излучений и излучений солнца, что создает повышенный уровень факторов, повреждающих наследственный материал всех обитателей станции. Микробы вынуждены адаптироваться к условиям недостатка питательных веществ и повышенного уровня ДНК-повреждающих факторов.

Грамм-положительные бактерии *Bacillus subtilis* рассматриваются в основном как безопасные для человека (GRAS, generally recognized as safe) и обладают мощной системой внеклеточной секреции белков. Благодаря этим особенностям штаммы *B. subtilis* используются в ветеринарии, медицине и различных отраслях промышленности, как пробиотики, сверхпродуценты иммуноактивных факторов, ферментов, аминокислот, и витаминов [3, 4].

В рамках исследований по оценке санитарно-гигиенических условий внутренних объемов космической станции проводятся исследования видового состава микробиома станции. Во время 20-й экспедиции (2009 г.) был выделен штамм *Bacillus subtilis*-20. Первичная идентификация штамма проведена с помощью системы автоматизированной идентификации микробных штаммов Vitek-60 (Bio Merieux).

В настоящей работе, повторная идентификация штамма проведена с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе Bruker Daltonik MALDI Biotyper, а также путем секвенирования участка рибосомных генов. Согласно полученным результатам штамм относится к *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*.

В экспериментах по выращиванию серии разведений бактериальной культуры на чашках Петри нами замечено, что штамм *B.subtilis*-20 формирует колонии большего размера, чем хорошо охарактеризованный "земной" штамм *B.subtilis*-168, использованный нами в качестве контрольного. На богатой питательной среде LB иногда происходит слияние колоний штамма *B.subtilis*-20 и последующее их распространение по поверхности агара с увеличением занимаемой площади как минимум в десять раз по сравнению с

размером колоний “земного” штамма. Это может быть объяснено как повышенной подвижностью бацилл и/или их ускоренным ростом и делением клеток.

В экспериментах по определению скорости роста культур *B.subtilis*-20 и *B.subtilis* 168 в жидких питательных средах с различным pH и при разных температурах роста установлено, что штамм *B.subtilis*-20 опережает штамм *B.subtilis*-168. Плотность культур штамма *B.subtilis*-20 выращенных в течение 16 и 36 часов примерно в два раза больше, чем у штамма *B.subtilis*-168. Таким образом, нами охарактеризован штамм *B.subtilis*-20, обладающий способностью к ускоренному росту и накоплению большей биомассы, по сравнению с “земным” штаммом.

Штамм *B.subtilis*-20, благодаря быстрому накоплению биомассы, может быть использован для дальнейшей разработки штаммов сверхпродуцентов белков, имеющих значение в биотехнологии и медицине.

#### Литература:

1 N.D. Novikova, N.A. Polikarpov, S.V. Poddubko, E.A. Deshevaya, *The results of microbiological research of environmental microflora of orbital station Mir*, in: *Proceedings of the 31st International Conference on Environmental Systems, Orlando, FL, USA, July 9–12, 2001, #2001-01-2310*. [2] D.L. Pierson, M.R. McGinnis, A.N. Viktorov, in: F.M. Sulzman, A.M. Genin (Eds.), *Space Biology and Medicine, Vol. II: Life Support and Habitability, American Institute of Aeronautics and Astronautics, Washington, DC, 1994, pp. 77–93*. [3] van Dijk and Hecker, 2013, *Bacillus subtilis: from soil bacterium to super-secreting cell factory. Microbial Cell Factories* 12:3. [4] Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J., Liu, L. 2017, *Metabolic engineering of Bacillus subtilis fueled by systems biology: Recent advances and future directions. Biotechnology Advances* 35, 20–30.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (Тема 0103-2014-0006 #58 Молекулярная генетика, механизмы реализации генетической информации, биоинженерия)

UDC 579.65

## CHARACTERISATION OF THE BACILLUS SUBTILIS 20 STRAIN AS A PLATFORM FOR THE DEVELOPMENT OF NEW BIOTECHNOLOGICALLY IMPORTANT STRAINS

P.Osipova<sup>1</sup>, D.Karpov<sup>2</sup>, A.Domashin, S.Kiseleva<sup>4</sup>, E.Chelarskaya<sup>2</sup>, M.Kotlov<sup>2</sup> A.Guridov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Peoples friendship university of Russia, Russia, 117198, Moscow, Mikluho-Maklaya, д. 10 к.2.

<sup>2</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Russia, Russia, 119991, Moscow, Vavilov str., 15

<sup>3</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Russia, Russia, 123007, Moscow, Khoroshevskoye shosse, 15

<sup>4</sup> Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin, Russia, 109472, Moscow, Academician Skryabin str., 15

*Bacillus subtilis* strains are of great importance in veterinary medicine, medicine and biotechnology. In the course of studies of the microbiom in the Russian segment of the International Space Station, the *B. subtilis*-20 strain was isolated. The strain has the ability for rapid growth and accumulation of more biomass than the terrestrial *B. subtilis* 168 strain, and therefore can be used as a platform for creating new producer strains.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, International Space Station, growth kinetics

Microorganisms are the oldest form of life on Earth. They are able to adapt to various extreme conditions and can therefore be found in the most unexpected places on our planet. Despite all the precautions and increased requirements for sanitation, microbes also appeared on space vehicles, including space stations. The sources of microbes can be an auto-microflora of cosmonauts, polymeric materials susceptible to colonization by microbes, as well as cargo delivered to a space station [1,2]. On the orbit of the space station, factors that protect terrestrial organisms from cosmic and solar radiation are weak, so there is increased level of factors that damage the genetic material of all inhabitants of the station. Microbes are forced to adapt to the conditions of a lack of nutrients and an increased level of DNA-damaging factors.

Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* are considered mainly as human safe (GRAS, generally recognized as safe) and possess a powerful system of extracellular secretion of proteins. Due to these properties, *B. subtilis* strains are used in veterinary medicine, medicine and various industries, as probiotics, producers of immunoactive factors, enzymes, amino acids, and vitamins [3,4].

In the course of studies on the assessment of the sanitary and hygienic conditions of the internal volumes of

the International Space Station, investigations are carried out to identify species of the station microbiome. During the 20th expedition (2009), the *Bacillus subtilis*-20 strain was isolated. The primary identification of the strain was carried out using the automated identification system for microbial strains of Vitek-60 (Bio Merieux).

In this study, the strain was again subjected to identification using MALDI-TOF mass spectrometry on a Bruker Daltonik MALDI Biotyper instrument, as well as by sequencing of a locus of ribosomal genes. According to the results obtained, the strain is *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*.

In the experiments on growing of series of bacterial culture dilutions on Petri dishes, we noticed that the *B. subtilis*-20 strain forms colonies of a larger size than the well-characterized "terrestrial" *B. subtilis*-168 strain used as a control strain. On the rich nutrient medium LB, the colonies of the *B. subtilis*-20 strain sometimes merge and spread on the agar surface to occupy at least ten times more area compared to colonies of "terrestrial" strain. This can be explained by the increased mobility of the bacilli and/or their accelerated growth and cell division.

In the experiments to determine the growth rate of *B. subtilis*-20 and *B. subtilis*-168 cultures in liquid nutrient media with different pH and at different growth temperatures, we found that *B. subtilis*-20 grow faster than *B. subtilis*-168. The density of *B. subtilis*-20 cultures grown for 16 and 36 hours is approximately twice as high as that of *B. subtilis*-168 strain. Thus, we have characterized the *B. subtilis*-20 strain, which has the ability for accelerated growth and accumulation of greater biomass, compared to the "terrestrial" strain.

*B. subtilis*-20 strain, due to the rapid accumulation of biomass, can be used for the further development of strains overproducing proteins used in biotechnology and medicine.

#### References:

- 1 N.D. Novikova, N.A. Polikarpov, S.V. Poddubko, E.A. Deshevaya, *The results of microbiological research of environmental microflora of orbital station Mir*, in: *Proceedings of the 31st International Conference on Environmental Systems*, Orlando, FL, USA, July 9–12, 2001, #2001-01-2310. [2] D.L. Pierson, M.R. McGinnis, A.N. Viktorov, in: F.M. Sulzman, A.M. Genin (Eds.), *Space Biology and Medicine*, Vol. II: *Life Support and Habitability*, American Institute of Aeronautics and Astronautics, Washington, DC, 1994, pp. 77–93. [3] van Dijk and Hecker, 2013, *Bacillus subtilis: from soil bacterium to super-secreting cell factory*. *Microbial Cell Factories* 12:3. [4] Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J., Liu, L. 2017, *Metabolic engineering of Bacillus subtilis fueled by systems biology: Recent advances and future directions*. *Biotechnology Advances* 35, 20–30.

**Grant:** The work is supported by the Program of Basic Studies of Government Academies of Sciences in 2013–2020 (subject 0103-2014-0006 #58 'Molecular Genetics, Mechanisms of Genetic Information Realization and Bioengineering')

УДК 574.5:543.399

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АМПИЦИЛЛИНА В МОДЕЛЬНОЙ ГИДРОЭКОСИСТЕМЕ

Мащенко З.Е. <sup>1</sup>, Бахарев В.В. <sup>1</sup>, Маслова Е.В. <sup>1</sup>, Малышкин С.С. <sup>1</sup>, Платонов И.А. <sup>2</sup>, Павлова Л.В. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет», Самара, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», Самара, Россия  
443100, Самара, ул. Молодогвардейская, 244.  
e-mail: mzinaida@yandex.ru

Разработана методика ВЭЖХ анализа ампициллина в модельной гидроэкосистеме.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ, ампициллин, активный ил.

Систематическое загрязнение воды противомикробными средствами приводит к возникновению резистентных форм микроорганизмов и появлению возбудителей, устойчивых к названным препаратам [1,2]. Концентрации фармацевтических препаратов, поступающих в водную среду, незначительны, однако, они представляют угрозу, поскольку их поступление носит постоянный характер. Особое внимание следует обратить на действие находящихся в окружающей среде антибиотиков. В связи с этим присутствие лекарственных веществ в окружающей среде превращается в значительную экологическую проблему.

Эффективным методом для анализа фармацевтических препаратов, в том числе антибиотиков, является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Высокая чувствительность, точность и специфичность этого метода дает значительное преимущество при определении остаточных количеств лекар-

ственных средств в сложных биологических и экологических системах [3,4].

Целью работы являлась разработка метода анализа ампициллина с использованием ВЭЖХ в модельной гидроэкоосистеме.

В эксперименте использовался активный ил городских очистных сооружений г. Самара.

Хроматографический анализ проводили на градиентной ВЭЖХ системе со спектрофотометрическим детектором Knauer "Azura". Детектирование проводили при длине волны 254 нм. Использовали хроматографическую колонку «Phenomenex» C18 (250\*3 мм) с размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза – ацетонитрил/вода/уксусная кислота в соотношении 80/19,5/0,5. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,5 см<sup>3</sup>/мин. Для обработки результатов применяли программное обеспечение «ClarityChrom».

Были подобраны оптимальные условия ВЭЖХ-анализа ампициллина в модельной системе с активным илом. Показано, что с течением времени концентрация антибиотика в активном иле постепенно снижалась. Уменьшение содержания ампициллина носило линейный характер.

Литература:

1. Баренбойм Г.М., Чиганова М.А., Березовская И.В. Особенности загрязнения поверхностных водных объектов компонентами лекарственных средств // Водное хозяйство России. – 2014. – № 3. – С. 131-141.
2. Маслова Е.В., Мащенко З.Е., Шаталаев И.В. Лекарственные препараты в окружающей среде // Аспирантский вестник Поволжья. – 2017. – № 1-2. – С. 215-217.
3. Маслова Е.В., Мащенко З.Е., Климович Ю.Н., Головин Е.В., Бахарев В.В., Шаталаев И.Ф. Хроматографический анализ бензилпенициллина натриевой соли в модельной гидроэкоосистеме // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VIII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: Состояние И Перспективы Развития» 17-20 марта 2015 г., – М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2015. – С. 397-398.
4. Шафигулин Р.В., Мащенко З.Е., Буланова А.В., Шаталаев И.Ф. Хроматографический анализ цефтриаксона в модельных гидроэкоосистемах // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2013. – Т.13. – № 1. – С. 75-82.

UDC 574.5:543.399

## CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF AMPICILLIN IN THE MODEL HYDROSYSTEM

Mashchenko Z.E.<sup>1</sup>, Bakharev V.V.<sup>1</sup>, Maslova E.V.<sup>1</sup>, Malyshev S.S.<sup>1</sup>, Platonov I.A.<sup>2</sup>, Pavlova, L.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Samara state technical University, Samara, Russia

<sup>2</sup> Samara University, Samara, Russia

443100, Samara, Molodogvardeyskaya str., 244.

e-mail: mzinaida@yandex.ru

The developed method of HPLC analysis of ampicillin in the model the hydrosystem.

**Key words:** HPLC, ampicillin, activated sludge.

Systematic water pollution antimicrobial agents leads to emergence of resistant forms of microorganisms and the emergence of pathogens resistant to these drugs [1,2]. The concentration of pharmaceuticals entering the aquatic environment are minor, however, they pose a threat, since their arrival is ongoing. Special attention should be paid to action in the environment of antibiotics. In this regard, the presence of pharmaceutical substances in the environment becomes a significant environmental problem.

An effective method for the analysis of pharmaceuticals, including antibiotics, is a high-performance liquid chromatography (HPLC). High sensitivity, precision and specificity of this method provides a significant advantage in determining the residual quantities of drugs in complex biological and ecological systems [3,4].

The aim of this work was to develop a method for the analysis of ampicillin by HPLC using in the model the hydrosystem.

Were used in the experiment activated sludge of municipal wastewater treatment plants the city of Samara.

Chromatographic analysis was performed on a gradient HPLC system with spectrophotometric detector Knauer "Azura". Detection was carried out at a wavelength of 254 nm. Used chromatographic column "Phenomenex" C18 (250\*3 mm) with a particle size of 5 microns. Mobile phase – acetonitrile/water/acetic acid in the ratio of 80/19,5/0,5. The flow rate of mobile phase was 0.5 cm<sup>3</sup>/min. For processing of results was used the software "ClarityChrom".

Were selected in the optimal conditions of HPLC analysis of ampicillin in the model system with active sludge. It is shown that over time the concentration of antibiotics in the activated sludge gradually decreased. Reduction of ampicillin were of linear character.

## References:

1. Barenboim G.M., Chiganova M.A., Berezovskaya I.V. Peculiarities of contamination of the surface water component object drugs // *Water economy of Russia*. – 2014. – № 3. – P. 131-141.
2. Maslova E.V., Mashchenko, E.Z., Shatalaev I.V. Drugs in the environment // *The Postgraduate Bulletin of the Volga region*. – 2017. – № 1-2. – P.215-217.
3. Maslova E.V., Mashchenko, E.Z., Klimochkin Yu.N., Golovin E.V., Bakharev V.V., Shatalaev I.F. Chromatographic analysis of benzylpenicillin sodium salt in a model hydrosystem // *Biotechnology: state and prospects of development: materials of the VIII Moscow International Congress "Biotechnology: State And prospects of Development" March 17-20, 2015 – Moscow: JSC "Expo-Biochim-technologies", RKHTU named D. I. Mendeleev, 2015. – P. 397-398.*
4. Shafigulin R.V., Mashchenko Z.E., Bulanov V.A., Shatalaev I.F. Chromatographic analysis of Ceftriaxone in the model hydroecosystems // *Sorption and chromatographic processes*. – 2013. – Vol. 13. – № 1. – P. 75-82.

УДК: УДК 579.61, ББК: 28.4

## СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ LACTOBACILLUS HELVETICUS D75 И D76 И ВЫЯВЛЕНИЕ В ИХ СОСТАВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КЛАСТЕРОВ СИНТЕЗА БАКТЕРИОЦИНОВ

**В.А.Торопов, Т.Я.Вахитов, О.Н.Шалаева, Е.К.Рощина**

Федеральное Государственное Унитарное Предприятие «Государственный научно – исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико – биологического агентства, Россия, 197110, Санкт - Петербург, Пудожская, 7, vtoropov.922@mail.ru, +7 (812) 499-16-84

Получены два завершённых аннотированных генома de novo штаммов *Lactobacillus helveticus* D75 и D76. В составе геномов обоих штаммов обнаружены кластеры генов синтеза бактериоцина гельветицин J. Установлен индуцибельный характер экспрессии генов синтеза гельветицина J для *L. helveticus* D75 и D76.

**Ключевые слова:** гетероантагонизм, бактериоцины, секвенирование ДНК, PacBio

Молочнокислые бактерии *L. helveticus* D75 и D76 обладают выраженной пробиотической активностью и антагонистической активностью против патогенных и условно-патогенных штаммов бактерий [1, 2].

Целью исследования было провести аннотацию de novo геномов *L. helveticus* D75 и D76 и выявить функционирующие генетические кластеры синтеза бактериоцинов в их составе.

Два завершённых генома de novo были получены при помощи секвенирования геномных ДНК *L. helveticus* D75 и D76 по методу SMRT на секвенаторе PacBio RS II с последующей сборкой геномов по методу HGAP в программе SMRT Analysis v. 2.3.0. Протяжённость геномов de novo *L. helveticus* D75 и D76 составила 2053066 и 2058319 пар оснований соответственно. При помощи теста средней нуклеотидной идентичности (ANI) была проведена видовая идентификация штаммов D75 и D76. Так, ранее принадлежащие к виду *L. acidophilus* штаммы D75 и D76 были переклассифицированы как вид *L. helveticus*.

После аннотации геномов de novo в программе PGAP (NCBI) было обнаружено 2092 и 2068 кодирующих последовательностей для *L. helveticus* D75 и D76 соответственно. Также было обнаружено наличие 317 и 265 псевдогенов в составе геномов штаммов *L. helveticus* D75 и D76 соответственно.

В геномах *L. helveticus* D75 и D76 выявлены кластеры генов синтеза бактериоцина гельветицин J. В состав обнаруженных кластеров входят: ген бактериоцина гельветицин J, ген белка иммунитета к собственному бактериоцину и предполагаемый ген белка транспорта бактериоцина во внеклеточную среду.

При добавлении в ростовую среду *L. helveticus* D75 и D76 модельной смеси метаболитов *E. coli* (Актофлор-С®) в концентрации 0,12 мг/мл экспрессия гена гельветицина J усиливается в среднем в 2 раза, а при концентрации 0,5 мг/мл в 2,8 раза. При этом экспрессия гена белка иммунитета к гельветицину J увеличивается в 2 и в 2,5 раза соответственно.

Получены два завершённых аннотированных генома de novo штаммов *L. helveticus* D75 и D76. Геномы двух исследуемых штаммов имеют в своём составе по одному кластеру генов, отвечающих за синтез бактериоцина гельветицин J. Показано, что усиление бактериального гетероантагонизма штаммов *L. helveticus* D75 и D76 связано с синтезом бактериоцина гельветицин J и что оно имеет индуцибельный характер.

## Литература:

1. Вахитов Т.Я., Вербицкая Н.Б., Добролеж О.В., Полевая Е.В., Кобатов А.И. Влияние метаболитов пробиотических и патогенных бактерий на антагонистическую активность *Lactobacillus acidophilus* ДН№75 // КубГАУ: политем.

сет.электр.науч.журнал. - 2013. - №92 (08). <http://ej.kubagro.ru/2013/08/pdf/22.pdf> (дата обращения: 07.12.2017)  
2. Торопов В.А., Шалаева О.Н., Рощина Е.К., Вахитов Т.Я., Ситкин С.И. Выявление генов бактериоцинов у пробиотических штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* Д№75 и *Lactobacillus acidophilus* Д№76 // Эксп.Клин.Гастроэн. - 2016. - №10 (134). - С.58-65.

**Финансирование:** средства Федерального Государственного Унитарного Предприятия «Государственного научно – исследовательского института особо чистых биопрепаратов» Федерального медико – биологического агентства

UDC 579.61, BBC 28.4

## GENOME SEQUENCING OF PROBIOTIC BACTERIA *LACTOBACILLUS HELVETICUS* D75 AND D76 AND DETECTION IN THEIR COMPOSITION GENETIC CLUSTERS OF BACTERIOGIN SYNTHESIS

V.Toropov, T.Vakhitov, O.Schalaeva, E.Roschina

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of FMBA of Russia, Russia, 197110, opreparations of FMBA of Russia, Russia, 197110, Saint - Petersburg, Pudozhsky street, 7

Two annotated whole genomes de novo are obtained for strains *Lactobacillus helveticus* D75 and D76. In genomes of both strains clusters of genes for synthesis of bacteriocin helveticin J were found. An inducible character of expression of bacteriocin synthesis genes have been established for *L. helveticus* D75 and D76.

Key words: heterotagonism, bacteriocins, DNA sequencing, PacBio

Lactic acid bacteria *Lactobacillus helveticus* D75 and D76 have pronounced probiotic activity and antagonistic activity against pathogenic and opportunist bacteria strains [1, 2].

The purpose of the study was to carry out an annotation of *L. helveticus* D75 and D76 genomes de novo and to reveal in their composition functioning genetic clusters of bacteriocins synthesis.

Two complete genomes de novo were obtained by the sequencing of *L. helveticus* D75 and D76 genomic DNA by the SMRT method on the PacBio RS II sequencer with subsequent assembly of genomes by the HGAP method in SMRT Analysis v. 2.3.0 program. The length of genomes de novo of *L. helveticus* D75 and D76 strains were 2,053,066 and 2,958,319 base pairs respectively. Using an average nucleotide identity test (ANI) it was carried out species identification of D75 and D76 strains. Thus, previously belonging to the species *L. acidophilus* strains D75 and D76 were reclassified as species *L. helveticus*.

After annotation of genomes de novo in PGAP program (NCBI) were found 2,092 and 2,062 coding sequences for *L. helveticus* D75 и D76 respectively. Also, the presence of 317 and 265 pseudo genes were revealed in the genomes of *L. helveticus* D75 и D76 strains respectively.

In genomes of *L. helveticus* D75 and D76 were revealed clusters of genes responsible for the synthesis of bacteriocin helveticin J. In composition of detected clusters include: gene of bacteriocin helveticin J; gene of bacterial immunity protein to one's own bacteriocin and putative protein gene of bacteriocin's transport into extracellular environment.

When adding a model mixture of *E. coli* metabolites (Aktoflor-C®) to the growth medium of *L. helveticus* D75 and D76 in concentration of 0.12 mg/ml expression of helveticin J gene is increased average 2 times, while in concentration of 0.5 mg/ml in 2.8 times. In the same time, expression of gene of immunity protein to helveticin J is increased in 2 and 2.5 times respectively.

Two complete annotated genomes de novo of *L. helveticus* D75 and D76 strains were obtained. Both genomes of two investigating strains have one cluster of genes that are responsible for bacteriocin helveticin J synthesis. It is shown that bacterial heteroantagonism intensification of *L. helveticus* D75 and D76 strains is connected with synthesis of bacteriocin helveticin J and that it's had inducible character.

References: 1. Vakhitov T.Y., Verbitskaya N.B., Dobrolezh O.V., Polevaya E.V., Kobatov A.I. The effect of probiotic and pathogenic bacteria metabolites on antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* D № 75 // KubSAU:polythem. elect.scientf.journ. - 2013. - №92 (08) <http://ej.kubagro.ru/2013/08/pdf/22.pdf> (the date of recourse: 07.12.2017) 2. Toropov. V.A., Shalaeva O.N., Roshchina E.K., Vakhitov T.Y., Sitkin S.I. Identification of bacteriocin genes in probiotic strains of lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* D-75 and *Lactobacillus acidophilus* D-76 // *exprim.gastroent.* - 2016. - №10 (134) – P.58-65

**Grant:** fund of State Research Institute of Highly Pure Biopreparations of FMBA of Russia



УДК 579.6. 615.2.929

## РОЛЬ З.В. ЕРМОЛЬЕВОЙ КАК ОСНОВОПОЛОЖНИКА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Л.П. Блинкова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия  
 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5а  
 b.larus@mail.ru

Приводятся сведения о приоритетной роли З.В. Ермольевой в создании отечественных антибактериальных средств - бактериофагов, пенициллина, других препаратов, методов диагностики холеры. Сообщается о героических фактах биографии ученого в борьбе с холерой и раневыми осложнениями.

**Ключевые слова:** холера, фаги, диагностика, антибиотики, лизоцим, интерферон

З.В. Ермольева, родилась 2(15) октября 1897 года, выросла на Донской земле. После окончания в 1916 г. гимназии и Ростовского Мединститута в 1921 г. она решила стать микробиологом и изучать вибрионы. Получив диплом, работала на кафедре микробиологии Донского Университета и заведовала бактериологическим отделом в Северокавказском Бактериологическом Институте. В 1922 г. в Ростове началась холера. З.В. Ермольева изучает холероподобные вибрионы, т.к. их роль в этиологии болезни была не ясна. Способность этого микроба вызывать холеру проверила на себе. Выпив культуру, заболела и могла погибнуть, но доказала, что неагглютинируемый вибрион стал агглютинируемым. Выделенный ею светящийся вибрион позднее назвали в ее честь. З.В. Ермольева получила также результаты о хлороустойчивости вибрионов, что вошло в санитарные нормы водопроводной воды. С 1925 г. она начала работать в Москве в Биохимическом институте. В 1934 г. ее отдел вошел в состав ВИЭМ. Известность З.В. Ермольевой стала международной после публикации статей в Европе. Она заинтересовалась токсинами микробов, аминами как антигенами, взаимным воздействием микробов. В 1927 г. с Л.А. Зильбером и В.А. Энгельгардтом участвовала в конгрессе в Берлине. Так как в 30 – 40-х гг. холера была возможна, З.В. Ермольева создала лечебные холерные фаги. В 1939 -41 гг. в Афганистане и Иране у наших границ началась холера. З.В. Ермольева с группой врачей апробировала на населении холерные фаги. Яркий талант ученого, бесстрашного врача, организатора у З.В. Ермольевой особенно проявился в годы ВОВ. В 1942 г. в Сталинграде возникла угроза холеры: заболевания были не только в немецких войсках, но и в городе. Она организовала в подвале выпуск фага, а затем профилактику холеры у людей. Разработала также метод экспресс-диагностики холеры. В 1942 г. с опасностью для жизни вернулась в Москву на санитарном самолете. За великий подвиг по профилактике холеры в 1943 г. Правительство наградило З.В. Ермольеву Орденом Ленина, а затем вместе с Л. Якобсон Государственной премией. Премию отдала на строительство боевого самолета ее имени. Но для защиты раненых от гнойных инфекций нужен был мощный препарат. В Англии и Америке Г. Флори и Э. Чейн создали препарат пенициллин из штамма *Penicillium*, полученного в 1928 г. А. Флемингом, З.В. Ермольева с группой начала разрабатывать отечественный пенициллин из выделенного Т.И. Балежиной штамма *P. crustosum* и в 1942-1943 гг. спасала раненых от сепсиса и гангрены. В 1944 г. Г. Флори приехал, чтобы сравнить препараты. Сравнение штаммов *in vitro* и активности пенициллинов в клинике показало превосходство нашего менее очищенного препарата. В 1945 г. Флеминг, Флори и Чейн получили Нобелевскую премию за создание пенициллина. В 1944 г. после проверки нашего пенициллина в госпиталях начали его производство. Но предстояло получить очищенный сухой препарат. Для совершенствования технологии и очистки пенициллина открыли специальную лабораторию. З.В. Ермольева создала еще другие антибиотики (стрептомицин, тетрациклин, левомецетин, бициллин, дипасфен, эрициклин), эсмолин из молок рыб, кристаллический лизоцим. В 1960 г. первой изучила интерферон для лечения гриппа. Авторитетная З.В. Ермольева была представителем страны в ВОЗ. С 1956 г. возглавляла Государственный комитет по антибиотикам, работала в редакциях журналов, выступала на Международных конгрессах. Имела 535 научных работ, вырастила 180 докторов и кандидатов наук. Заслуги З.В. Ермольевой отмечены многими наградами. С 1945 по 1947 гг. она - директор Института профилактики инфекций, с 1947 г. - заводом ВНИИА. В 1945 г. стала членом-корреспондентом АМН, с 1963 г. - академиком. С 1952 г. до конца жизни возглавляла кафедру микробиологии и лабораторию антибиотиков в ЦИУ врачей. Она была отзывчивым, дружелюбным человеком. З.В. Ермольева скончалась 2 декабря 1974 г. Похоронена в Москве.

UDK 579.6. 615.2.929

## THE ROLE OF Z.V. ERMOLEVA AS THE FOUNDER OF THE NATIONAL ANTIBACTERIAL DRUGS

L.P. Blinkova

*I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia  
105064, Moscow, Maliy Kazenniy per., 5A  
b.larus@mail.ru*

Data on the priority role of Z.V. Ermoleva in the creation of national antibacterial agents - bacteriophages, penicillin, other drugs, methods of diagnosis of cholera. The heroic facts of the scientist's biography in the fight against cholera and wound complications are reported.

**Key words:** cholera, phages, diagnostics, antibiotics, lysozyme, interferon

Z.V. Ermoleva was born 2 (15) October 1897, grew up on the Don land. After graduating from high school in 1916 and Rostov Medical Institute in 1921, she decided to become a microbiologist and study Vibrios. After receiving of Diploma, she worked at the Department of Microbiology of the Donskoy University and was head of the bacteriological Department in the North Caucasus Bacteriological Institute. In 1922, in Rostov came the cholera. Z.V. Ermoleva studies cholera-like vibrios, because their role in the etiology of the disease was not clear. The ability of this microbe to cause cholera checked on herself. Drinking culture got sick and could have died but proved that non-agglutinated vibrio became agglutinated. The isolated luminous Vibrio was named later in her honor. Z.V. Ermoleva has also received the results of chlororesistance vibrios that were included in the sanitary tap water standards. the results in a sanitary standards Since 1925, she began working in Moscow at the Biochemical Institute. In 1934 her Department became a part of VIEM. Z.V. Ermoleva's fame has become international after the publication of articles in Europe. She interested in microbial toxins, amines as antigens, the mutual influence of microbes. In 1927, with L.A. Zilber and V.A. Engelhardt participated in the Congress in Berlin. As in 1930-1940, cholera was possible, Z.V. Ermoleva created therapeutic cholera phages. In 1939 -41, in Afghanistan and Iran on our borders came the cholera. Z.V. Ermoleva with a group of doctors tested cholera phages on the population. Brilliant talent of a scientist, a fearless doctor, organizer Z.V. Ermoleva especially manifested during World War II. In 1942 in Stalingrad there was a threat of cholera: the disease was not only in the German army, but also in the city. She organized in the basement the production of phage, and then prevention of cholera in humans. She also developed a method for rapid diagnosis of cholera. In 1942, at the risk of his life he returned to Moscow on sanitary plane. For the great feat of cholera prevention in 1943, the Government awarded the order of Lenin to Z.V. Ermolev, and then together with L. Jacobson Stalin prize. The award was transferred to the creation of a combat aircraft named after her. But for protection of the wounded from purulent infections was need a powerful drug. In England and America, G. Florey and E. Chain created a drug penicillin from the strain *Penicillium*, obtained in 1928 by A. Fleming, Z.V. Ermoleva and the group began to develop national penicillin from the strain of *P. crustosum* isolated by T.I. Balezina and in 1942-1943 she saved the wounded from sepsis and gangrene. In 1944, G. Flory came to compare the drugs. Comparison of strains in vitro and penicillin activity in the clinic showed superiority of our less purified preparation. In 1945 Fleming, Florey and Chain received the Nobel prize for the creation of penicillin. In 1944, after checking our penicillin in hospitals began its production. But it was necessary to receive the cleared dry preparation. To improve the technology and cleaning penicillin opened a special laboratory. Z.V. Ermoleva created other antibiotics (streptomycin, tetracycline, chloramphenicol, bitsillin, dipastena, recyclin), akmolin from milt of fishes, crystalline lysozyme. In 1960, she was the first to study interferon for treatment of influenza. In 1945 she became a corresponding member of the Academy of medical Sciences, 1963 - an academician. Authoritative Z.V. Ermoleva was country representative at WHO. Since 1956 she headed The State Committee on antibiotics, worked in editions of magazines, acted at the International Congresses. She had 535 scientific works, she raised 180 doctors and candidates of Sciences. Merit Z.V. Ermoleva marked by decorations. From 1945 to 1947, she was the Director of the Institute for the prevention of infections, since 1947 - head of the Department of VNIIA. From 1952 to the end of her life she headed the Microbiology Department and the laboratory of antibiotics in the doctors ' CIU. She was a sympathetic, friendly person. Z.V. Ermoleva died 2 Dec 1974, buried in Moscow.

## БИОМАТЕРИАЛЫ В БИОТЕХНОЛОГИЯХ И МЕДИЦИНЕ

### BIOMATERIALS IN BIOTECHNOLOGY AND MEDICINE

1. 3-D КОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА И PRP ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ, А.Ревкова .....	198
3D CONSTRUCT BASED ON NEURAL STEM CELLS, RECOMBINANT SPIDROIN AND PRP FOR NEURAL TISSUE REGENERATION, V.Revkova .....	199
2. АЛЛОГЕННЫЙ КАЛЬЦИЙСОДЕРЖАЩИЙ БИОМАТЕРИАЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С НАРУШЕНИЕМ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ, Писарева Е.В., Власов М.Ю., Горченкова М.Ю., Даниэль М.А., Глотов А.А., Карпова Е.В., Тимченко Е.В., Волова Л.Т.....	200
ALLOGENIC CALCIUM-CONTAINING BIOMATERIAL FOR TREATMENT OF DISEASES CONNECTED WITH VIOLATION OF BONE TISSUE METABOLISM, Pisareva E.V., Vlasov M.Yu., Gorchenkova M.Yu., Daniel M.A., Glotov A.A., Karpova E.V., Timchenko E.V., Volova L.T. ....	201
3. АПКОНВЕРТИРУЮЩИЕ НАНОФОСФОРЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ, Мачкова Ю.С., Шолина Н.В., Хоченкова Ю.А., Хоченков Д.А.....	202
UPCONVERSION NANOPARTICLES FOR MALIGNANT NEOPLASMS TREATMENT, Y.Machkova, N.Sholina, Y.Khochenkova, D.Khochenkov .....	205
4. АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ВЫСОХШИХ МИКРОКАПЕЛЬ ИЗ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА, Михеев А.Ю., Морозов В.Н. ....	208
ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF DRY RESIDUES OF MICRODROPLETS FROM EXHALED AIR, Mikheev A.Y., Morozov V.N. ....	209
5. БИОРЕАКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С БЕЛКАМИ, В.В.Панченко, А.М.Стойнова, П.В.Маков, Я.М.Станишевский .....	209
BIOREACTIVITY OF NANOPARTICLES AND THEIR INTERACTION WITH PROTEINS, V.Panchenko, Stoynova, P.Makov, Y.Stanishevsky.....	211
6. БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРОДУЦЕНТОМ ГЛУКОНАЦЕТОВАСТЕР HANSENII ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ, Громовых Т.И., Киселева О.И., Люндуп А.В., Фельдман Н.Б., Луценко С.В. ....	212
BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE BY PRODUCENT GLUCONACETOBACTER HANSENII FOR DIRECT USE IN MEDICINE, Gromovykh T.I., Kiselyova O.I., Lundup F.V., Feldman N.B., Lutsenko S.V.....	213
7. БИОСОВМЕСТИМЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ, Черногорцева М.В., Кильдеева Н.Р., Успенский С.А., Демина Т.С., Дроздова М.Г., Марквичева Е.А. ....	214
BIOCOMPATIBLE MATRICES BASED ON HYALURONIC ACID FOR REGENERATIVE MEDICINE, Chernogortseva M.V., Kildeeva N.R., Uspenskii S.A., Demina T.S., Drozdova M.G., Markvicheva E.A. ....	215
8. БИОСОМЕСТИМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ СОПОЛИМЕРОВ N-ВИНИЛ-2-ПИРРОЛИДОНА КАК СИСТЕМА ВВЕДЕНИЯ И ДОСТАВКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ, Куликов П.П., Кусков А.Н., Лусс АЛ., Горячая А.В., Штильман М.И.....	216
BIOCOMPATIBLE POLYMERIC NANOPARTICLES BASED ON AMPHIPHILIC COPOLYMERS OF N-VINYL-2-PYRROLIDONE AS A SYSTEM FOR THE INTRODUCTION AND DELIVERY OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC SUBSTANCES, Kulikov P.P., Kuskov A.N., Luss A.L., Goryachaya A.V., Shtilman M.I. ....	217
9. ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ А-ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ НА КИСЛОРОДНЫЙ ВЗРЫВ НЕЙТРОФИЛОВ, В.А.Щелконогов, Г.А.Джавадова, Н.С.Шастина, Г.М.Сорокоумова, К.С.Сарвас, А.В.Чеканов, О.А.Баранова, К.Д.Казаринов, Э.Ю.Соловьева.....	218
THE INFLUENCE OF THE LIPOSOMAL FORM OF A-LIPOIC ACID ON OXIDATIVE BURST OF NEUTROPHILS, V.Shchelkonogov, G.Javadova, N.Shastina, G.Sorokoumova, K.Sarvas, A.Chekanov, O.Baranova, K.Kazarinov, E.Solovieva .....	219
10. ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ТИТАНА НА АДГЕЗИЮ ФИБРОБЛАСТОВ, Хрунык Ю.Я., Фадеев Ф.А., Луговец Д.В., Маракулина А.В., Губаева О.В., Беликов С.В. ....	221

THE EFFECT OF TITANIUM SURFACE TREATMENT ON FIBROBLASTS ADHESION, Khrunyk Y.Y., Fadeyev F.A., Lugovets D.V., Marakulina A.V., Gubaeva O.V., Belikov S.V.....	222
11. ВЛИЯНИЕ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ТИПА ЯДРО@ОБОЛОЧКА Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au, Тагирова М.А., Веселов М.М., Ефремова М.В., Бараковская И., Секундо Ф., Мажуга А.Г., Головин Ю.И., Клячко Н.Л.,.....	223
EFFECT OF ALTERNATING MAGNETIC FIELD ON THE STRUCTURE AND CATALYTIC ACTIVITY OF IMMOBILIZED ON THE SURFACE OF CORE@SHELL Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au NANOPARTICLES PHENYLACETONMONOOXYGENASE, Tagirova M.A., Veselov M.M., Efremova M.V., Barakovskaya I., Secundo F., Majouga A.G., Golovin I.I., Klyachko N.L. ....	224
12. ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА, ИНКАПСУЛИРОВАННОГО В ПОЛИМЕРЫ, Е.М. Лялина, В.С. Зуева, С.А.Минаева.....	225
INFLUENCE OF SURFACE-SELECTIVE LASER SINTERING ON THE ACTIVITY OF TRIPSIN INCAPULATED IN POLYMERS, E.M. Lyalina, V.S. Zueva, S.A.Minaeva.....	226
13. ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ГИДРОФОБНОГО ДОМЕНА ЛИПОАМИНОКИСЛОТ НА ТРАНСФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИПОСОМ НА ИХ ОСНОВЕ, Загитова Р.И., Лосева А.А., Носова А.С., Колоскова О.О., Буданова У.А., Себякин Ю.Л.....	227
INFLUENCE STRUCTURE OF HYDROPHILIC DOMAINS OF LIPOAMINOACIDS ON TRANSFECTION ACTIVITY OF CATIONIC LIPOSOME, Zagitova R.I., Loseva A.A., Nosova A.S., Koloskova O.O., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. ....	228
14. ВОЗМОЖНОСТЬ НАПРАВЛЕНИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ, А. А. Олешкевич, Ф. И. Василевич .....	229
POSSIBILITY OF RESPONDING CYSTOSTATIC EFFECT OF MEDICINAL PREPARATIONS ON CELLS, A. A. Oleshkevich, F. I. Vasilevich.....	230
15. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, Н.Л. Клячко, М.Ж. Haney, Y. Zhao, R. Gupta, И.М. Ле-Дейген, Е.О. Куценко, Z. He, T. Patel, A. Piroyan, M. Sokolsky, A.B. Кабанов, E.V. Batrakova .....	230
EXTRACELLULAR VESICLES FOR DRUG DELIVERY, N.L. Klyachko, M.J. Haney, Y. Zhao, R. Gupta, E.G. Plotnikova, I.M. Le-Deygen, E.O. Kutsenok, Z. He, T. Patel, A. Piroyan, M. Sokolsky, A.V. Kabanov, E.V. Batrakova .....	231
16. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ГИБРИДНОГО БЕЛКА ИНСУЛИНА АСПАРТ, Полудин А.Е., Васина Т.А., Гусаров Д.А., Буровик Д.А.....	232
ISOLATION AND SEPARATION OF THE INSULIN ASPART FUSION PROTEIN, Poludin A. E., Vasina T. A., Gusarov D. A., Burovik D.A.....	232
17. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ PICHIA PASTORIS И СПОСОБ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, Калинина А. Н., Савельев Н. С., Хохлачев Н. С.....	233
HIGH EFFECTIVE RECOMBINANT STAMP OF THE HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN ON THE BASIS OF YEAST PICHIA PASTORIS AND THE METHOD OF ITS CULTIVATION, Kalinina A. N., Savelev N. S., Hohlachev N.S.....	234
18. ГИБРИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ, М.В.Ефремова, А.С.Гаранина, В.А.Науменко, М.А.Абакумов, U.Wiedwald, А.Г.Мажуга, Н.Л.Клячко.....	235
HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES: NEW POSSIBILITIES FOR THERANOSTICS, M.Efremova, A.Garanina, V.Naumenko, M.Abakumov, U.Wiedwald, A.Majouga, N.Klyachko.....	236
19. ГИДРОТЕРМАЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ, Шпунтова Д.В., Вострикова А.М., Бакал А.А., Сухоруков Г.Б., Горячева И.Ю. ....	237
HYDROTHERMAL TREATMENT OF POLYELECTROLYTE MICROCAPSULES, Shpuntova D.V., Vostrikova A.M., Bakal A.A., Sukhorukov G.B., Goryacheva I.Yu. ....	238
20. ДЕЙСТВИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА И НИЗКОЙ ДОЗЫ BMP-2 НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ В ЧЕРЕПНЫХ ДЕФЕКТАХ КРИТИЧЕСКОГО РАЗМЕРА У МЫШЕЙ , Карягина А.С.Орлова П.А., Манских В.Н., Кривоzubов М.С., Манухина М.С., Струкова Н.В., Попонова М.С., Бартов М.С., Лунин В.Г., Громов А.В.....	238
EFFECT OF ERYTHROPOETIN AND LOW DOSE BMP-2 ON BONE TISSUE REGENERATION IN CRITICAL SIZE CRANIAL DEFECTS MURINE MODEL, Karyagina A.S., Orlova P.A., Manskih V.N., Krivozubov M.S., Manukhina M.S., Strukova N.V., Poponova M.S., Bartov M.S., Lunin V.G., Gromov A.V.....	240

21. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ "СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ" НОВЫХ ФОЛАТ-СОДЕРЖАЩИХ ЛИПОКОНЪЮГАТОВ В СОСТАВЕ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ, Е.В.Шмендель, Т.О.Кабилова , .....	241
STUDY OF RELATIONSHIP "STRUCTURE-ACTIVITY" OF NEW FOLATE-CONTAINING LIPOCONJUGATES IN COMPOSITION OF CATIONIC LIPOSOMES, E.Shmendel, T.Kabilova, N.Morozova, M.Zenkova, M.Maslov.....	242
22. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЦИНА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТА МИКРОКОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ МУКОЗАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА, Шолина Е.А., Филатова Л.Ю., Володькин Д.В., Балабушевич Н.Г. ....	243
THE USE OF MUCIN FOR RECEIVING BASED ON VATERITE MICROCONTAINERS FOR MUCOSAL DELIVERY OF DOXORUBICIN, Sholina E.A., Filatova L.Y., Volodkin D.V., Balabushevich N.G. ....	244
23. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БЕЗРЕАГЕНТНОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ, А.С.Харькова, В.А.Арляпов.....	245
USE OF NANOMATERIALS FOR THE DEVELOPMENT OF A REAGENTLESS BIOSENSOR FOR GLUCOSE DIAGNOSTIC IN BLOOD, A.Kharkova, V.Arlyapov .....	246
24. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГNETИТ-ЗОЛОТО ТИПА «ГАНТЕЛЬ» В КАЧЕСТВЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ: IN VITRO И IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЯ, Гаранина А. С., Ефремова М. В., Науменко В. А., Мельников П. А., Чехонин В. П., Савченко А. Г., Абакумов М. А., Wiedwald U., Мажуга А. Г. ....	247
DUMBELL MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES APPLICATION AS A PLATFORM FOR MALIGNANT TUMORS THERANOSTICS: IN VITRO AND IN VIVO INVESTIGATION, Garanina A. S., Efremova M. V., Naumenko V. A., Melnikov P. A., Chekhonin V. P., Savchenko A. G., Abakumov M. A., Wiedwald U., Majouga A. G. ....	248
25. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СШИВАЮЩИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО БЫЧЬЕГО ПЕРИКАРДА С ЗАДАННЫМИ СТРУКТУРНЫМИ И БИОМЕХАНИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ, Гребеник (Ивукина) Е.А., Верясова Н.Н., Истранова Е.В., Истранов Л.П., Чурбанов С.Н., Шавкута Б.С., Курков А.В., Мельников П.А., Лажко А.Э., Тимашев П.С. ....	249
DEVELOPING BIOPLASTIC MATERIALS BASED ON THE DECELLULARIZED BOVINE PERICARDIUM WITH PROGRAMMED STRUCTURE AND BIOMECHANICAL PROPERTIES VIA UTILIZING CROSS-LINKING APPROACH, Grebenik (Ivukina) E.A., Veryasova N.N., Istranova E.V., Istranov L.P., Churbanov S.N., Shavkuta B.N., Kurkov A.V., Melnikov P.A., Lazhko A. E., Timashev P.S. ....	250
26. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ IgY ЖЕЛТОЧНЫХ АНТИТЕЛ В ОТНОШЕНИИ STREPTOCOCCUS MUTANS, Плешкова О.Г., Леонов В.В., Арипов В.С., Каплин В.С., Каплина О.Н., Колосова Е.А., Щербakov Д.Н.....	251
THE RESEARCH OF THE IgY YOLK ANTIBODIES ACTIVITY REFERRING TO STREPTOCOCCUS MUTANS, Pleshkova O.G., Leonov V.V., Aripov V.S., Kaplin V.S., Kaplina O.N., Kolosova E.A., Sherbakov D.N.....	252
27. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСАЖДЕНИЯ ЗАРЯЖЕННОГО НАНОАЭРОЗОЛЯ В ФИЗИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЛЕГКОГО, Канев И. Л., Морозов В. Н.....	253
CHARGED NANOAEROSOL DEPOSITION STUDIED IN A PHYSICAL LUNG MODEL, Kanev I. L., Morozov V. N.....	253
28. ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ БЛОКИРОВКИ СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ, Миркасымов А.Б., Зелепукин И.В., Никитин М.П., Никитин П.И., Деев С.М. ....	254
INVESTIGATION OF PARAMETERS INFLUENCING THE EFFICIENCY OF THE MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM BLOCKADE, Mirkasymov A.B., Zelepukin I.V., Nikitin M.P., Nikitin P.I., Deyev S.M.....	255
29. КОМПОЗИТНЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ СОДЕРЖАЩИХ ХИТОЗАН КРИОГЕЛЕЙ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА ДЛЯ ДООЧИСТКИ СТОЧНЫХ И ПИТЬЕВЫХ ВОД, Ульябаева Г.Р., Подорожко Е.А., Губочкина А.А., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. ....	256
COMPOSITE SORBENTS BASED ON THE CHITOSAN-CONTAINING CRYOGELS OF POLYVINYL ALCOHOL FOR THE FINISHING PURIFICATION OF WASTE AND DRINKING WATERS, Ul'yabaeva G.R., Podorozhko E.A., Gubochkina A.A., Kildeeva N.R., Lozinsky V.I.....	257
30. КРИТИЧЕСКИЙ ВЗГЛЯД НА ЭВОЛЮЦИЮ МАТЕРИАЛОВ И БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНО-ХРЯЩЕВЫХ ДЕФЕКТОВ, Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Каралкин П.А. ....	258

CRITICAL VIEW ON THE EVOLUTION OF MATERIALS AND BIORESORBABLE TISSUE ENGINEERING CONSTRUCTS FOR SUBSTITUTION OF BONE AND CARTILAGE DEFECTS, Sergeeva N.S., Sviridova I.K., Karalkin P.A. ....	259
31. ЛИПИДОПОДОБНЫЕ МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ МИРНК, В.И.Уварова.....	259
TARGETED SIRNA DELIVERY BASED ON LIPIDOID-COATED MAGNETIC NANOPARTICLES, V.Uvarova .....	261
32. МАГНИТНЫЕ ЛИПОСОМЫ С АГРЕГАТАМИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИСЛОЕ ДЛЯ УПРАВЛЯЕМОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВ, Петрунин А.В., Власова К.Ю., Ле-Дейген И.М., Жигачёв А.О., Прусов А.Н., Головин Ю.И., Кабанов А.В., Клячко Н.Л. ....	262
MAGNETIC LIPOSOMES WITH NANOPARTICLE CLUSTERS IN BILAYERS FOR REMOTE-CONTROLLED DRUG RELEASE, Petrunin A.V., Vlasova K.Yu., Le-Deygen I.M., Zhigachev A.O., Prusov A.N., Golovin Y.I., Kabanov A.V., Klyachko N.L. ....	263
33. МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕРАНОСТИКОВ, А.С.Семкина, М.А.Абакумов, А.С.Скорилов, А.В.Иванова, А.Г.Мажуга, В.П.Чехонин.....	264
MAGNETIC NANOPARTICLES AS A PROMISING MATERIAL FOR THERANOSTICS CREATION, A.Semkina, M.Abakumov, A.Skorikov, A.Ivanova, A.Majouga, V.Chekhonin.....	265
34. МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ЗАГРУЖЕННЫЕ ЦИСПЛАТИНОМ, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КОНТЕЙНЕР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ, Иванова А.В., Семкина А.С., Скорилов А.С., Абакумов М.А., Чехонин В.П. ....	267
MAGNETIC NANOPARTICLES OF IRON OXIDE LOADED BY CISPLATINUM AS A PERSPECTIVE CONTAINER FOR DIAGNOSTICS AND THERAPY OF MALIGNANT NOVELTIES, Ivanova A.V., Semkina A.S., Abakumov M.A., Skorikov A.S., Chekhonin V.P. ....	268
35. МАГНИТОРАЗДЕЛЯЕМЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР НА ОСНОВЕ ГЛЮКООКСИДАЗЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ D-ГЛЮКОЗЫ, Е.П.Голикова, Н.В.Лакина, В.Г.Матвеева .....	269
MAGNETICALLY SEPARABLE BIOCATALYST ON THE BASIS OF GLUCOSE OXSIDASE, E.Golikova, N.Lakina, V.Matveeva.....	270
36. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ODE-МОДЕЛЬ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ПРОЦЕССОВ ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ С ПОМОЩЬЮ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ С РЕКОМБИНАНТНЫМИ ФАКТОРАМИ BMP-2 И ЭРИТРОПОЭТИНОМ, Демиденко А.В., Громов А.В., Карягина А.С. ....	271
A MATHEMATICAL ODE-MODEL FOR SIMULATION OF OSTEOGENESIS DURING THE REGENERATION OF BONE TISSUE DEFECTS BY USING OSTEOPLASTIC MATERIALS WITH RECOMBINANT FACTORS BMP-2 AND ERYTHROPOEITIN, Demidenko A.V., Gromov A.V., Karyagina A. S.....	272
37. МАТРИКСЫ И МИКРОСФЕРЫ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ, Чеснокова Д. В., Жаркова И. И., Волков А.В., Стамболиев И.А., Мураев А.А., Бонарцев А. П. ....	273
SCAFFOLDS AND MICROSPHERES FROM POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FOR BONE TISSUE ENGINEERING, Chesnokova D. V., Zharkova I. I., Volkov A. V., Stamboliev I. A., Muraev A. A., Bonatsev A. P. ....	274
38. МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ ГЛИКОКОНЪЮГАТАМИ УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ АТТРАКЦИЮ К КЛЕТКАМ ПЕЧЕНИ, Бражников Г.Т., Шиловский И.П., Колоскова О.О., Носова А.С., Хаитов М.Р.....	274
MODIFICATION OF THE LIPOSOME SURFACE WITH GLYCOCONUGATES INCREASES THEIR ATTRACTION TO THE LIVER'S CELLS, Brazhnikov G.T., Shilovskiy I.P., Koloskova O.O., Nosova A.S., Khaitov M.R.....	275
39. ОЛИГОМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ β-ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ФТОРХИНОЛОНОВ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ, Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. ....	276
OLIGOMERIC NANOPARTICLES OF β-CYCLODEXTRINES AS PERSPECTIVE SYSTEMS OF DELIVERY SYSTEMS OF FLUOROCHINOLONES WITH SUSTAINED RELEASE, Skuredina A.A., Kudryashova E.V.....	277
40. НАНОЭМУЛЬСИИ КАК ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ, Урланова С.В., Привалова А.М., Марквичева Е.А., Зайцева Е.А., Головин, Ю.И., Клячко Н.Л. ....	278
NANOEMULSIONS AS PLATFORM FOR INTRACELLULAR DRUG DELIVERY, Uglanova S.V., Privalova A.M., Markvicheva E.A., Zaitseva E.A., Golovin U.I., Klyachko N.L.....	279

41. НОВЫЕ БИВАЛЕНТНЫЕ КЕРАСОМООБРАЗУЮЩИЕ ЛИПИДЫ, В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ, Миронова М.С., Кондря У.Р., Буданова У.А., Себякин Ю.Л.....	280
NEW BIVALENT CERASOME-FORMING LIPIDES, AS COMPONENTS OF DELIVERY SYSTEMS OF ANTITUMOR PREPARATIONS, Mironova M.S., Kondrya U.R., Denieva Z.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. ....	281
42. НОВЫЕ ГУАНИДИНИЛИРОВАННЫЕ АМФИФИЛЫ В КАЧЕСТВЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ ДОСТАВКИ БАВ И ИХ ВИЗУАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКЕ, Лосева А. А., Буданова У.А., Себякин Ю. Л. ....	282
NEW GUANIDINYLATED AMPHIFILES AS HIGH EFFECTIVE AGENTS FOR DELIVERY BAS AND THEIR VISUALIZATION IN THE CELL, Loseva A. A., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. ....	284
43. ОДНОДОМЕННЫЕ МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК МЕДИАТОРЫ ЛОКАЛЬНЫХ ДЕФОРМАЦИЙ МАКРОМОЛЕКУЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ИХ ПОВЕРХНОСТИ, Веселов М.М., Леонтьев С.А., Ефремова, М.В., Упоров И.В., Мажуга А.Г., Кабанов А.В. Головин Ю.И. Клячко Н.Л.....	285
SINGLE-DOMAIN MAGNETIC NANOPARTICLES AS MEDIATORS OF LOCAL DEFORMATIONS OF IMMOBILIZED ON ITS SURFACE MACROMOLECULES, Veselov M.M., Leontyev S.A., Efremova M.V., Uporov I.V., Majouga A.G., Kabanov A.V., Golovin Yu.I., Klyachko N.L. ....	286
44. ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ДЕГИДРОКВЕЦЕТИНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ С УЛУЧШЕННЫМИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ, М.Е. Хлупова, И.С. Васильева, Г.П. Шумакович, О.В. Морозова, Е.А. Зайцева, В.А. Чертков, А.К. Шестакова, А.В. Кисин, К.В. Лисицкая, А.И. Ярополов.....	286
OXIDATIVE POLYMERIZATION OF DEHYDROQUERCETIN FOR PRODUCTION OF NEW COMPOUNDS WITH IMPROVED PHARMACEUTICAL PROPERTIES, M.E. Khlupova, I.S.Vasil'eva, G.P. Shumakovich, O.V. Morozova, E.A. Zaitseva, V.A. Chertkov, A.K. Shestakova, A.V.Kisin, K.V. Lisitskaya, A.I. Yaropolov.....	287
45. ПЕРСОНИФИЦИРОВАННЫЙ БИОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ РАСТВОРИМОЙ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ, И.Р.Гильмутдинова, П.С.Еремин, Н.В.Меньшутина, Д.Д.Ловская.....	288
PERSONALIZED BIOPLASTIC MATERIAL BASED ON SOLUBLE AND DECELLULARIZED EXTRACELLULAR MATRIX FOR REGENERATIVE MEDICINE, I.Gilmutdinova, P.Eremin, N.Menshutina, D.Lovskaya.....	290
46. ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО МИЦЕЛИЯ LAETIPORUS SULPHUREUS MZ-22 И FOMITOPSIS OFFICINALIS TYV-2006 НА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЕ, Гаврюшина И.А.....	291
OBTAINING THE IMMOBILIZED MYCELIUM OF LAETIPORUS SULPHUREUS MZ-22 AND FOMITOPSIS OFFICINALIS TYV-2006 ON BACTERIAL CELLULOSE, Gavryushina I.A. ....	292
47. ПОЛУЧЕНИЕ МАТРИКСОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ: СПОСОБЫ ОЧИСТКИ ОТ КЛЕТОК ПРОДУЦЕНТА И ЭНДОТОКСИНОВ, М.В.Булат, К.В.Дутка.....	293
OBTAINING OF BACTERIAL CELLULOSE MATRICES: METHODS OF PURIFICATION FROM THE CELLS OF THE PRODUCER AND ENDOTOXINES, M.Bulat, K.Dutka.....	294
48. ПОЛУЧЕНИЕ ПЛЕНОК И ВЫСОКОПОРИСТЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИМИЧЕСКОЙ СШИВКОЙ, Сажнев Н.А., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. ....	295
PREPARATION OF FILMS AND HIGH-POROUS POLYMER MATRICES BASED ON CHITOSAN MODIFIED BY CHEMICAL CROSS-LINKING, Sazhnev N.A., Kildeeva N.R., Lozinsky V.I.....	296
49. ПОЛУЧЕНИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТОДОМ ГИДРОТЕРМАЛЬНОГО СИНТЕЗА НА ОСНОВЕ ДЕКСТРАН СУЛЬФАТА НАТРИЯ, Николаева А.Н., Вострикова А.М, Бакал А.А., Сухоруков Г.Б., Горячева И.Ю. ....	297
PRODUCTION OF CARBON NANOPARTICLES BY HYDROTHERMAL SYNTHESIS OF SODIUM DEXTRAN SULFATE SOLUTIONS, Nikolaeva A.N., Vostrikova A.M., Bakal A.A., Sukhorukov G.B., Goryacheva I. Yu. ....	298
50. РАЗРАБОТКА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ТОВАРОВ НАРОДНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ, А.Д.Туровская, А.С.Харькова, В.А.Арляпов.....	298
DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR TO DETERMINE THE INTEGRAL TOXICITY OF CONSUMER GOODS, A.Turovskaya, A.Kharkova, V.Urlyapov.....	300
51. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАН-АЛЬГИНАТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ОЦЕНКА ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ, Лозицкая О.А., Красноштанова А.А.....	301

DEVELOPMENT OF THE SYSTEM OF ORAL DELIVERY OF DOXORUBICINE ON THE BASIS OF CHITOSAN-ALGINATE NANOPARTICLES AND EVALUATION OF ITS IMPACT ON THE ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES, Lozitskaya OA, Krasnoshtanova A.A. ....	302
52. РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ АНАЛИЗА ТРАЕКТОРИЙ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ СУБМИКРОННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ, Седенков П.Н., Курьяков В.Н., Сафонов А.В. ....	303
DEVELOPMENT AND APPLICATION OF EXPERIMENTAL SETUP FOR NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS FOR RESEARCH OF SUBMICRON BIOLOGICAL OBJECTS, Sedenkov P.N., Kuryakov V.N., Safonov A.V. ....	303
53. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОКАПСУЛ С АМИНОКИСЛОТОЙ, Лазурина Л.П., Шубина Г.Н. ....	304
THE DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF MICROCAPSULES WITH THE AMINO ACID, Lazurina L. P., Shubina G. N. ....	305
54. РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ СЕЛЕН-МЕТАЛЛ-ЛИПИДНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ИЗ ХЛОРЕЛЛЫ (CHLORELLA VULGARIS BEIJ.), Боднар О.И., Ковальская Г.Б., Грубинко В.В. ....	306
METABOLISM REGULATION IN RATS DURING THE EXPERIMENT WITH SELENIUM-METAL-LIPID MEDICATIONS MADE FROM CHLORELLA (CHLORELLA VULGARIS BEIJ.), Vodnar O.I., Koval'ska H.B., Grubinko V.V. ....	307
55. РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЭРИТРОПОЭТИН ЧЕЛОВЕКА С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ГЕПАРИН-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ: СИНТЕЗ В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI И ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКА, Карягина А.С., Грунина Т.М., Н.Б. Поляков, Попонова М.С., Ляшук А.М., П.А. Орлова, Лунин В.Г., Громов А.В. ....	308
RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN WITH ADDITIONAL HEPARIN-BINDING DOMAIN: SYNTHESIS IN ESCHERICHIA COLI CELLS AND PROTEIN CHARACTERISTICS, Karyagina A.S., Grunina T.M., Polyakov N.B., Poponova M.S., Lyashchuk A.M., Orlova P.A., Lunin V.G., Gromov A.V. ....	309
56. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССА СУШКИ БИОМАТЕРИАЛОВ МЕТОДАМИ ТЕРМОВЛАГОМЕХАНИКИ С ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКОЙ, И.А.Шорсткий.....	310
IMPROVEMENT OF THE BIOMATERIALS DRYING PROCESS BY THE THERMAL-MECHANICAL METHODS ASSISTED WITH ELECTROPHYSICAL PRE-TREATMENT, I.Shorstkii.....	312
57. СТАБИЛЬНЫЕ И БИОСОВМЕСТИМЫЕ ТЕРАНОСТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ, Котельникова П.А., Шипунова В. О., Никитин М.П., Деев С.М.....	314
STABLE AND BIOSAMPATIBLE THERANOSTIC AGENTS BASED ON MAGNETIC NANOPARTICLES AND RECOMBINANT PROTEINS, Kotelnikova P.A. , Shipunova V. O. Nikitin M.P. Deyev S. M. ....	315
58. СУСПЕНЗИОННАЯ ФОРМА ВОЛОКНИСТОГО КОМПОНЕНТА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА: СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ, МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ, Н.В.Калмыкова, И.А.Демьяненко, А.В.Шишкина, Ю.С.Хац, А.П.Суслов.....	316
SUSPENDED FORM OF FIBROUS EXTRACELLULAR MATRIX: METHOD FOR PRODUCING, MICROSCOPIC EXAMINATION, N.Kalmykova, I.Demyanenko, A.Shishkina, Y.Khats, A.Suslov.....	317
59. УГЛЕРОДНЫЕ СОРБЕНТЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ, М.С.Дроздецкая, Л.Г.Пьянова, Л.К.Герунова, А.В.Седанова.....	318
CARBON SORBENTS MODIFIED WITH BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES: SYNTHESIS, PROPERTIES, APPLICATION, M.Drozdetzkaya, L.P'yanova, L.Gerunova, A.Sedanova.....	319
60. УЛУЧШЕНИЕ ДЕСОРБЦИИ ФУРОКУМАРИНОВ В ВОДНЫЙ РАСТВОР ПОСЛЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА CaCO3 С ЛИЗОЦИМОМ И НАНОЧАСТИЦАМИ МАГНЕТИТА, Смирнова О.Д., Паламарчук К.В., Калашникова И.В., Камышинский Р.А., Букреева Т.В.....	320
IMPROVEMENT OF FUROCUMARINS DESORPTION OF IN AQUEOUS SOLUTION AFTER THEIR IMMOBILIZATION ONTO CaCO3 WITH LYSOZYME AND MAGNETITE NANOPARTICLES , Smirnova O.D., Palamarchuk C.V., Kalashnikova I.V., Kamyshinsky R.A., Bukreeva T.V.....	322
61. ФОРМИРОВАНИЕ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА, Лясникова В.Н., Калёнов С.В., Сорокин В.В., Складнев Д.А., Кузнецов А.Е.....	323
SYNTHESIS OF IRON-CONTAINING NANOPARTICLES USING BACTERIAL COMMUNITIES FROM LAKE ONEGO, Lyasnikova V.N., Kalenov S.V., Sorokin V.V., Skladnev D.A., Kuznetsov A.E.....	324



62. ЭНДОЛИЗИНЫ БАКТЕРИОФАГОВ: ЛИЗИС КЛЕТОК E.COLI ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАНИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ, А.Д. Усвалиев, А.В. Никитин, П.Г. Рудаковская, 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.....	325
BACTERIOPHAGE ENDOLYSINS: LYSIS E.COLI UNDER ULTRALOW-FREQUENCY ALTERNATING MAGNETIC FIELD IN THE PRESENCE OF MAGNETIC NANORODS, A.D. Usvaliev, A.V. Nikitin, P.G. Rudakovskaya, 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 .....	326
63.ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРОВЕЗИКУЛ ММСК НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ, Р.С.Илларионов, Н.В.Мещерякова, А.Я.Лаврикова, В.В.Морозов, И.Е.Станишевская .....	327
DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF MICROVESICLES OF MMSC ON THE PROLIFERATION OF DERMAL HUMAN FIBROBLASTS UNDER OXIDATIVE STRESS, R.Illarionov, N.Meshcheryakova, A.Lavrikova, V.Morozov V.V., I.Stanishevskaya.....	328

УДК: 57.085.23

## 3-D КОНСТРУКЦИЯ НА ОСНОВЕ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА И PRP ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ НЕРВНОЙ ТКАНИ

**А.Ревкова**

Федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства, Россия, 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28, veronicarevkova@gmail.com, +79307531363

Была получена 3D-тканеинженерная конструкция на основе первично репрограммированных нейральных прогениторных клеток в комбинации с рекомбинантным спидроином и обогащенной тромбоцитами плазмой.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия нервной ткани, нейральные стволовые клетки, рекомбинантный спидроин, PRP, спинальная травма

Позвоночно-спинномозговая травма является одной из самых сложных и трудно поддающихся лечению состояний. Одним из перспективных направлений лечения таких травм является трансплантация нейральных стволовых (NSC) и/или нейральных прогениторных клеток (NPC). Однако, процент приживаемости и интеграции таких клеток в организме не высок. Таким образом, на данный момент основной проблемой в тканевой инженерии является проектирование и изготовление подходящей конструкции, которая может имитировать природный внеклеточный матрикс для нейральной стволовых и/или прогениторных клеток (NSC/NPC), а также быть биосовместимой и биodeградируемой.

Одним из таких каркасов является спидроин — белок каркасной нити паучьей паутины. Показано, этот белок, способствует адгезии NSC/NPC, а также усиливает нейральную дифференцировку за счет нейронспецифической последовательности GRGGL.

Кроме того, для воссоздания внеклеточного матрикса наилучшим образом подходят гидрогели за счет высокого содержания в них воды, биосовместимости и простой перестраиваемости. Наиболее перспективным в этом отношении гидрогелем является обогащённая тромбоцитами плазма (PRP). В ряде исследований показано, что PRP, за счёт содержания различных факторов роста (PDGF-AB, TGF-β1, IGF-1, VEGF) и тромбоцитарных экзосом, содержащих микроРНК и другие сигнальные молекулы, способствует нейрогенезу и росту аксонов, усилению пролиферации и миграции Шванновских клеток а также экспрессии NGF, GDNF. Указанные свойства PRP позволяют рассматривать её как перспективный источник аутологических факторов роста и биомиметический скаффолд, создающий необходимое микроокружение, в частности, для регенерации периферического нерва.

Целью данного исследования была разработка 3D-конструкции на основе нейральных прогениторных клеток, полученных путём прямого репрограммирования (DrNPCs) на основе PRP и анизотропного комплексного скаффолда из рекомбинантных спидроинов (rS1/9 + rS2/12) и поликапролактона (PCL).

В результате, было показано, что разработанный нами двухкомпонентный матрикс, состоящий из

«жидкого» компонента на основе гидрогеля из PRP с нейробазальной средой и анизотропного скаффолда rSPCL значительно увеличивает пролиферацию и нейральную дифференцировку DrNPCs за счёт комплексного взаимодействия компонентов PRP, и создания трёхмерного биомиметического пространства из PRP и биосовместимого с DrNPCs и rSPCL. Анизотропный rSPCL не только обеспечивает адгезию гидрогеля с DrNPCs к поверхности, но и выполняет функцию направляющего скаффолда, задающего нужный вектор роста аксонов. Разработанная конструкция может быть использована как в качестве кондукта при регенерации периферического нерва, так и при создании регенеративной технологии лечения травмы спинного мозга.

*Литература:*

1. Ahlfors J.-E., Elayoubi R. *New World Laboratories Inc. Methods for reprogramming cells and uses thereof // US 13/843,713*. 31 2. Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI, Klinov DV, Sidoruk KV, Esipova NG, et al. *A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. J Neuroimmune Pharmacol 2009; 4:17-27* 3. Sanchez M, Anitua E, Delgado D, Sanchez P, Prado R, Orive G, Padilla S. *Platelet-rich plasma, a source of autologous growth factors and biomimetic scaffold for peripheral nerve regeneration. Expert Opin Biol Ther. 2017 Feb;17(2):197-212*. 4. Takeuchi M, Kamei N, Shinomiya R, Sunagawa T, Suzuki O, Kamoda H, Ohtori S, Ochi M. *Human platelet-rich plasma promotes axon growth in brain-spinal cord coculture. Neuroreport. 2012 Aug 22;23(12): 712-6*. 5. Yousefifard M, Rahimi-Movaghar V, Nasirinezhad F et al. *Neural stem/progenitor cell transplantation for spinal cord injury treatment; A systematic review and meta-analysis. Neuroscience. 2016 May 13;322: 377-97*

UDC 57.085.23

## 3D CONSTRUCT BASED ON NEURAL STEM CELLS, RECOMBINANT SPIDROIN AND PRP FOR NEURAL TISSUE REGENERATION

V.Revkova

*Federal Research Clinical Center of the Federal Medico-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia, Russia, 115682, Moscow, Orekhovy Blvd, 28*

We have created a 3D tissue engineered construct based on primarily reprogrammed neural progenitor cells in combination with recombinant spidroin and platelet-rich plasma

**Key words:** tissue engineering of neural tissue, neural stem cells, recombinant spidroin, PRP, spinal injury

Spinal cord injury is one of the most complex and hard-to-treat conditions. One of the most promising directions of treatment for such injuries is transplantation of neural stem cells (NSC) and/or neural progenitor cells (NPC). However, the fraction of such cells which survive and integrate in the organism is not high. Thus, the main current problem of tissue engineering is design and preparation of a suitable construct which may mimic the native extracellular matrix for neural stem and/or progenitor cells (NSC/NPC) and also be biocompatible and biodegradable.

One of such scaffolds is spidroin, a protein of the spider dragline. This protein has been shown to facilitate NSC/NPC adhesion and to enhance neural differentiation due to its non-specific GRGGL sequence, as well.

Besides, hydrogels are most suitable for the reconstruction of the extracellular matrix due to the high water content, biocompatibility and simple tuning. Among those, the most promising hydrogel is platelet-rich plasma (PRP). A number of studies have shown that PRP, due to the presence of different growth factors (PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1, IGF-1, VEGF) and trombocytic exosomes containing microRNA and other signal molecules, provides neurogenesis and axon growth and migration of Schwann cells, as well as NGF, GDNF expression. The mentioned PRP properties allow considering it as a prospective source of autologous growth factors and a biomimetic scaffold creating the necessary microenvironment, in particular, for peripheral nerve regeneration.

The aim of this study was the development of a 3D construct based on neural progenitor cells prepared via direct reprogramming (DrNPCs), PRP and anisotropic complex scaffold from recombinant spidroins (rS1/9 + rS2/12) and polycaprolactone (PCL).

As a result, we have shown that the two-component matrix we have developed, consisting of a PRP hydrogel-based "liquid" component with a neurobasal medium and an anisotropic rSPCL scaffold, essentially increases DrNPCs' proliferation and neural differentiation, due to complex interaction of PRP components and creation of a 3D biomimetic space from PRP biocompatible with DrNPCs and rSPCL. The anisotropic rSPCL not only provides adhesion of the hydrogel with DrNPCs to the surface, but also has a function of a guiding scaffold which determines the necessary vector of axon growth. The developed construct may be applied both as a conduit for

peripheral nerve regeneration and in the creation of a regenerative technology for spinal cord injury treatment.

References:

1 Ahlfors J.-E., Elayoubi R. *New World Laboratories Inc. Methods for reprogramming cells and uses thereof // US 13/843,713. 31 2 Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI, Klinov DV, Sidoruk KV, Esipova NG, et al. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. J Neuroimmune Pharmacol 2009; 4:17-27 3 Sanchez M, Anitua E, Delgado D, Sanchez P, Prado R, Orive G, Padilla S. Platelet-rich plasma, a source of autologous growth factors and biomimetic scaffold for peripheral nerve regeneration. Expert Opin Biol Ther. 2017 Feb;17(2):197-212. 4 Takeuchi M, Kamei N, Shinomiya R, Sunagawa T, Suzuki O, Kamoda H, Ohtori S, Ochi M. Human platelet-rich plasma promotes axon growth in brain-spinal cord coculture. Neuroreport. 2012 Aug 22;23(12): 712-6. 5 Yousefifard M, Rahimi-Movaghar V, Nasirinezhad F et al. Neural stem/progenitor cell transplantation for spinal cord injury treatment; A systematic review and meta-analysis. Neuroscience. 2016 May 13;322: 377-97*

УДК 615.466

## АЛЛОГЕННЫЙ КАЛЬЦИЙСОДЕРЖАЩИЙ БИОМАТЕРИАЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С НАРУШЕНИЕМ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ

Писарева Е.В. <sup>1</sup>, Власов М.Ю. <sup>2</sup>, Горченкова М.Ю. <sup>1</sup>, Даниэль М.А. <sup>1</sup>, Глотов А.А. <sup>1</sup>, Карпова Е.В. <sup>1</sup>, Тимченко Е.В. <sup>1</sup>, Волова Л.Т. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королёва, Самара, Россия;

<sup>2</sup> Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия  
 443086, Самара, ул. Мичурина, д. 154, кв. 113  
 e-mail: mvlasov1@rambler.ru

Получен инновационный аллогенный минеральный имплантационный биоматериал, содержащий фракцию наноразмерных частиц. Показано, что биоматериал имеет органоминеральный состав, аналогичный таковому для нативной костной ткани, обеспечивающий его высокую биосовместимость.

**Ключевые слова:** гидроксиапатит; кальцийсодержащие материалы; остеорезорбция; остеоиндукция; остеопороз.

Гидроксиапатит является кальцийсодержащим материалом и используется не только в хирургии и стоматологии при замещении костных дефектов, но и для коррекции метаболических нарушений костной ткани при остеорезорбции и остеопорозе [1, 2, 3]. Известно, что биогенный гидроксиапатит по сравнению с синтетическим сохраняет исходный химический состав и природную пористую структуру костного минерала [4, 5]. Порошок биогенного гидроксиапатита был получен по оригинальной методике, разработанной в Институте экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета [6], путем деминерализации костной ткани различных типов с последующим осаждением из раствора.

Рентгено-флуоресцентный анализ показал, что полученный биоматериал наряду с кальцием и фосфором содержит комплекс микроэлементов, которые входят в неорганический компонент костной ткани. С помощью трансмиссионной и сканирующей зондовой микроскопии установлено, что данный материал на 60-70% состоит из частиц размером менее 100 нм, таким образом, он может быть отнесен к бионаноматериалам. С помощью рентгеновского фазового анализа и ИК-Фурье-спектроскопии выявлено соответствие кристаллической фазы гидроксиапатиту, подтверждена гексагональная сингония кристаллической решетки биогенного гидроксиапатита. Исследования биоматериала с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния показали наличие в биоматериале минеральных и органических компонентов, среди которых были обнаружены фрагменты костных коллагеновых и неколлагеновых белков. Предполагается, что именно такой состав полученного биоматериала определяет его биосовместимость, остеокондуктивность и остеоиндуктивность.

Уникальные свойства полученного биоматериала могут служить основой для рекомендации к проведению его доклинических испытаний и дальнейшему применению в клинической практике лечения и профилактики заболеваний, связанных с нарушением метаболизма костной ткани.

Литература:

1. Писарева Е. В., Волова Л. Т., Власов М. Ю., Соколовская А. Б. Нанобиоматериал на основе минерального компонента костной ткани // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13. № 4 (4). С. 1203 – 1207.
2. Лоренс Риггз Б. Остеопороз: этиология, диагностика, лечение. М.: Бином, 2000. 558 с.
3. Шварц Г. Я. Фармакотерапия остеопороза. М.: Медицинское информационное агентство, 2002. 368 с.
4. Сыч Е. Е. Исследование химических, физических и технологических свойств пористых гранул биогенного гидроксиапатита // Вестник НТУ "ХПИ". 2009. №22. С. 166 – 170.
5. Otkar F. N. Microstructure and mechanical properties of sintered enamel hydroxyapatite // Acta Biomaterialia. 2007. Vol. 33, Issue № 7. P. 1309 – 1314.
6. Волова Л.Т., Подковкин В.Г., Писарева Е.В., Власов М.Ю. Биоимплантат для восстановления структуры и объема костной ткани // Патент РФ №2372892, 16.06.2008.

UDC 615.466

## ALLOGENIC CALCIUM-CONTAINING BIOMATERIAL FOR TREATMENT OF DISEASES CONNECTED WITH VIOLATION OF BONE TISSUE METABOLISM

Pisareva E.V. <sup>1</sup>, Vlasov M.Yu. <sup>2</sup>, Gorchenkova M.Yu. <sup>1</sup>, Daniel M.A. <sup>1</sup>, Glotov A.A. <sup>1</sup>, Karpova E.V. <sup>1</sup>, Timchenko E.V. <sup>1</sup>, Volova L.T. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Samara National Research University named after academician S.P.Korolev, Samara, Russia;

<sup>2</sup> Samara State Medical University, Samara, Russia

Apt 113, 154 Michurina St., Samara, 443086, Russia

e-mail: mvlasov1@rambler.ru

An innovative allogeneic mineral implantation biomaterial containing a fraction of nanoscale particles was obtained. It is shown that biomaterial has organomineral composition, similar to that for native bone tissue, providing its high biocompatibility.

**Key words:** hydroxyapatite; calcium-contained materials; osteoresorption; osteoinduction; osteoporosis.

Hydroxyapatite is a calcium-containing material and is used not only in surgery and dentistry for the replacement of bone defects, but also for the correction of metabolic bone disorders in osteoresorption and osteoporosis [1, 2, 3]. It is known that biogenic hydroxyapatite preserves the original chemical composition and natural porous bone mineral structure in comparison with the synthetic one [4, 5]. The biogenic hydroxyapatite powder was obtained by an original method developed at the Institute of Experimental Medicine and Biotechnology of Samara State Medical University [6] by demineralizing various types of bone tissue, followed by precipitation from the solution.

X-ray fluorescence analysis showed that an obtained biomaterial contains a complex of microelements along with calcium and phosphorus entering the inorganic component of bone tissue. By means of transmission and scanning probe microscopy, it was established that this material is on 60-70% composed of particles smaller than 100 nm, so that it can be attributed to bionanomaterials. Using X-ray phase analysis and IR Fourier spectroscopy, the correspondence of the crystalline phase of hydroxyapatite and hexagonal syngony of the crystal lattice of biogenic hydroxyapatite were confirmed. Studies of biomaterial using Raman spectroscopy showed the presence of mineral and organic components in biomaterial, among which fragments of bone collagen and non-collagen proteins were found. It was assumed that this composition of the biomaterial determines its biocompatibility, osteoconductivity and osteoinductivity.

The unique properties of the obtained biomaterial can serve as a basis for a recommendation for carrying out its preclinical tests and further application in clinical practice of treatment and prevention of diseases associated with metabolic disorders of bone tissue.

References:

1. Pisareva E.V., Volova L. T., Vlasov M.Yu. Nanobiomaterial based on the mineral component of bone tissue // News of Samara scientific center of RAS. 2011. Vol. 13, Issue № 4 (4). P. 1203 – 1207.
2. B. Lowrance Riggs. Osteoporosis: etiology, diagnostics, treatment. Binom, Moscow, 2000. 558 p.
3. Shwartz G. Pharmacotherapy of osteoporosis. Medical News Agency, Moscow, 2002. 368 p.
4. Sych E. E. The research of chemical, physical and technological properties of porous granules of biogenical hydroxyapatite // National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute". 2009. Issue № 22. P. 166 – 170.
5. Otkar F. N. Microstructure and mechanical properties of sintered enamel hydroxyapatite // Acta Biomaterialia. 2007. Vol. 33, Issue № 7. P. 1309 – 1314.
6. Volova L.T., Podkovkin V.G., Pisareva E.V., Vlasov M.Yu. Bioimplant for restoring the structure and volume of bone tissue // Patent of the Russian Federation №2372892, 16.06.2008.

УДК 616-006.6

## АПКОНВЕРТИРУЮЩИЕ НАНОФОСФОРЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Мачкова Ю.С.<sup>1,2</sup>, Шолина Н.В.<sup>1</sup>, Хоченкова Ю.А.<sup>1</sup>, Хоченков Д.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

<sup>2</sup> Российский университет дружбы народов, Москва, Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 10 к. 2.

e-mail: khochenkov@gmail.com

Апконвертирующие нанофосфоры (или наноразмерные антистоксовы фосфоры, НАФ) – новый класс наноматериалов, обладающих большим потенциалом для использования в экспериментальной и клинической онкологии. Отличительным свойством НАФ является способность конвертировать излучение инфракрасного диапазона, относительно глубоко проникающего в ткани живых организмов (1–1,5 см), в свет видимого и УФ-диапазонов, которые вызывают образование активных форм кислорода и применяются для фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных новообразований. В настоящей работе мы представляем возможность проведения фотодинамической терапии меланомы человека при помощи НАФ, покрытых биосовместимыми оболочками. Показано, что при активации НАФ, захваченных опухолевыми клетками, лазерным излучением с длиной волны 975 нм происходит индукция активных форм кислорода (АФК) под действием УФ-излучения, индуцируемого НАФ. При введении и активации НАФ лазерным излучением на мышах с перевитыми ксенографтами меланомы человека показано выраженное торможение роста опухоли (ТРО%=80±5%).

**Ключевые слова:** апконвертирующие нанофосфоры, меланома человека, апоптоз, фотодинамическая терапия, ксенографты опухолей

Апконвертирующие нанофосфоры (или наноразмерные антистоксовы фосфоры, НАФ) - неорганические кристаллы тетрафтороиттриата натрия (NaYF<sub>4</sub>), со структурой ядро/оболочка. Ядро представляет собой β-NaYF<sub>4</sub>, солегированный элементами трехвалентных лантаноидов: иттербия (Yb<sup>3+</sup>), тулия (Tm<sup>3+</sup>) и эрбия (Er<sup>3+</sup>). Кристаллическая оболочка состоит из нелегированного NaYF<sub>4</sub> [1-3]. НАФ представляют собой монодисперсные наночастицы в размерном диапазоне от 15 до 200 нм, имеющие коэффициент конверсии, определяемый как отношение излученной мощности к поглощенной, до 9%. При возбуждении НАФ лазером с длиной волны 975 нм индуцируется фотолюминесценция с линиями излучения в красной, зеленой, синей и УФ-областях, преобладание каждой из которых зависит соотношения лантаноидов в структуре НАФ. Важным элементом структуры наночастиц, являются биосовместимые оболочки, определяющие эффективность пассивного проникновения в опухоль из кровеносной системы и снижение захвата клетками иммунной системы (макрофаги, моноциты, дендритные клетки). Наиболее распространенным соединением для создания оболочек является полиэтиленгликоль и его производные [4-6]. Однако исследования последних лет показывают, что наночастицы на основе PEG могут индуцировать реакцию гиперчувствительности, активировать систему комплемента и секрецию антител против PEG. В связи с этим, в качестве перспективных носителей рассматриваются полисахариды, например, нейраминовые кислоты (Neuraminic acid, NAA), обладающие гидрофильной природой, свойствами биоразлагаемости и биосовместимости [7-12].

В быстрорастущих солидных опухолях, в частности меланоме, процесс васкуляризации дезорганизован. Вследствие патофизиологического несходства опухолевых очагов с нормальными тканями: недостаточности лимфатического дренажа, обширного фиброза и плотного внеклеточного матрикса – наночастицы размером от 10 до 200 нм могут выходить из сосудистого русла и накапливаться в интерстициальном пространстве опухолей. Феномен селективной экстравазации и удерживания макромолекул/наночастиц внутри опухолей был назван EPR-эффектом (permeability and retention effect). Пассивная доставка, обусловленная EPR-эффектом, при внутривенном введении позволяет свести к минимуму проникновение наночастиц в нормальные ткани и их эндоцитоз макрофагами печени и селезенки, что сравнительно увеличивает время циркуляции [13-15].

В рамках исследования было проведено сравнение эффективности эндоцитоза НАФ макрофагами мыши RAW264.7 с различными типами меченных родамином полимерных оболочек (только PMAO, PMAO+PEG, PMAO+NAA) при помощи методов проточной цитометрии (Рис.1) и конфокальной микроско-

пии (Рис.2.). Установлено, что наибольшей интернализации были подвержены НАФ с покрытием из PEG (свыше 95% клеток), наименьшей – из NAA (менее 25% клеток). Средний результат показали НАФ с покрытием только из PMAO (около 70%).

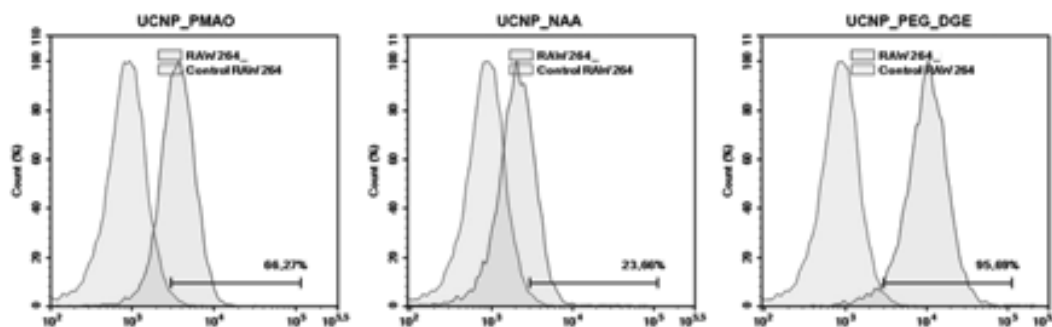


Рис.1. Интенсивность захвата НАФ макрофагами мыши RAW264.7 в зависимости от используемого покрытия: PMAO, PMAO+NAA, PMAO+PEG

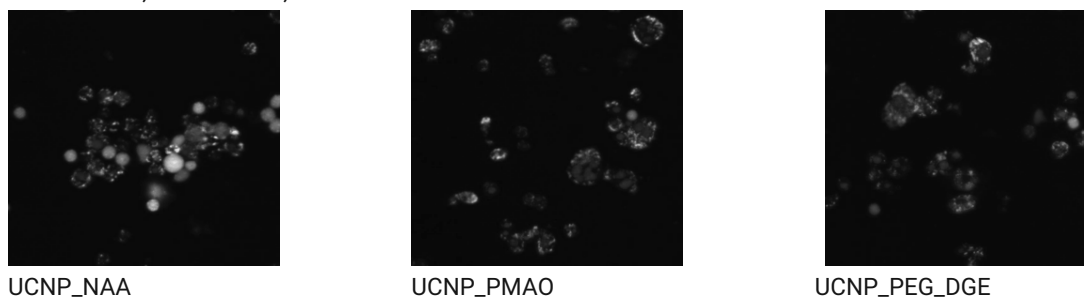


Рис.2. Эффективность эндоцитоза НАФ макрофагами мыши RAW264.7: НАФ меченные родамином (красный); клетки RAW264.1, меченные calcein-AM (зеленый); ядра клеток, меченные Hoechst33258 (синий)

Для определения механизма гибели клеток меланомы A375 под действием НАФ мы провели определение индукции активных форм кислорода (АФК) в цитоплазме клеток при введении наночастиц и облучении лазером с длиной волны 975 нм в дозе 1200 Дж/см<sup>2</sup> с применением флуоресцентного зонда для АФК – CellROX DeepRed (Thermo). Показано, что при облучении НАФ, захваченных клетками меланомы человека линии A375, в клетках образуется большое количество АФК, усиливающих флуоресцентный сигнал от зонда CellRox (Рис.3.). При облучении 975 нм клеток меланомы без НАФ индукции АФК не происходит. Таким образом, основным механизмом ФДТ с использованием НАФ является индукция АФК.

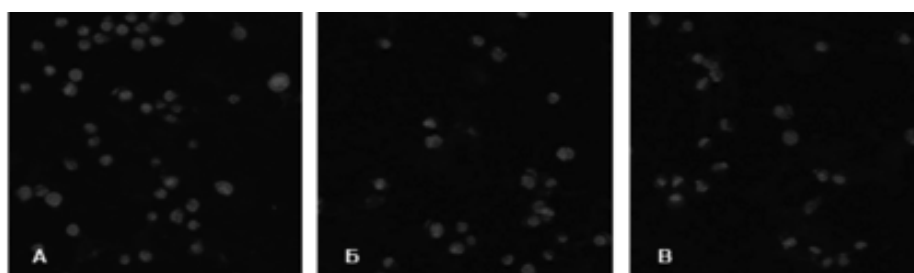


Рис.3. Индукция АФК в клетках меланомы A375.

А – НАФ PEG-DGE + облучение 975 нм, Б – облучение 975 нм, В – контроль

Для изучения противоопухолевой активности НАФ на ксенографтах меланомы человека клетки линии A375 были подкожно перевиты бестимульным мышам линии Balb/c nu/nu в количестве 2×10<sup>6</sup>. После достижения ксенографтами размера 100 мм<sup>3</sup> были введены внутривенной введены НАФ и через 60 минут проведено облучение опухоли. Мышей наблюдали в течение 30 дней после облучения. Показано, что при облучении 975 нм опухоли с НАФ наблюдается выраженное торможение роста, достигающее значения ТРО%=80±5% на 30-е сутки после введения наночастиц и облучения лазером. При исследовании гистологических препаратов опухолей контрольных и опытных групп при помощи TUNEL метода (Roche) установлено увеличение числа специфически окрашенных апоптотических опухолевых клеток в опытной группе, что подтверждает эффективность ФДТ при помощи НАФ (Рис.4.).

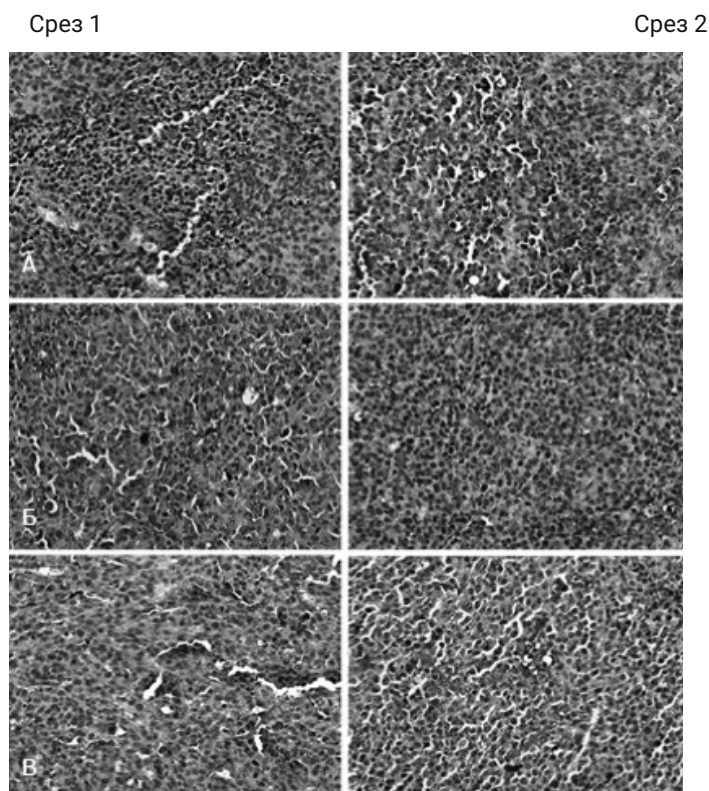


Рис.4. Индукция апоптоза под действием НАФ: А – УФ-излучающие НАФ + облучение 975 нм, Б – облучение 975 нм (контроль), В – НАФ, без УФ-излучения + облучение 975 нм

Литература:

1. Page R.H., Schaffers K.I., Waide P.A., Tassano J.B., Payne S.A., Krupke W.F., Bischel W.K. Upconversion-pumped luminescence efficiency of rare-earth-doped hosts sensitized with trivalent ytterbium//*Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, 1998. Vol. 15, P. 996-1008
2. Yi G.S., Sun B.Q., Yang F.Z., Chen D.P., Zhou Y.X., Cheng J. Synthesis and characterization of high-efficiency nanocrystal up-conversion phosphors: Ytterbium and erbium codoped lanthanum molybdate//*Chem. Mater.* 2002. Vol. 14. P. 2910-4
3. Boyer J-C., Cuccia L.A., Capobianco J.A. Synthesis of Colloidal Upconverting NaYF<sub>4</sub>: Er<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup> and Tm<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup> monodisperse nanocrystals//*Nano Lett.* 2007. Vol. 7(3). P. 847-852
4. Khaydukov E.V., Rocheva V.V., Semchishen V.A., Seminogov V.N., Sokolov V.I., Zvyagin A.V., Akhmanov A.S., Panchenko V.Ya., Nechaev A.V., Generalova A.N., Shekhter A.B. Opticheskaya vizualizatsiya opukholevykh tkaney s primeneniem antistoksovykh nanochastits//*Vestnik Rossiyskogo fonda fundamental'nykh issledovaniy [RFBR Journal]*. 2014 № 4 (84):7-17.
5. Nadort A., Sreenivasan V.K.A., Song Z., Grebenik E.A., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Panchenko V.Ya., Zvyagin A.V. Quantitative imaging of single upconversion nanoparticles in biological tissue//*PLoS ONE*. 2013. Vol. 8(5): e63292
6. Guller A.E., Generalova A.N., Petersen E.V., Nechaev A.V., Trusova I.A., Landyshev N.N., Zvyagin A.V. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells//*Nano Research*. 2015. Vol.8 (5), P. 1546-1562
7. Judge A., McClintock K., Phelps J.R., MacLachlan I. Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to pegylated liposomes//*Mol. Ther.* 2006. Vol.13, P. 328-337.
8. Hamad I., Al-Hanbali O., Hunter A.C., Rutt K.J., Andresen T.L., Moghimi S.M. Distinct polymer architecture mediates switching of complement activation pathways at the nanosphere-serum interface: Implications for stealth nanoparticle engineering//*ACS Nano*. 2010. Vol. 4, P. 6629-6638.
9. Choi K. Y., Chung H., Min K.H., Yoon H.Y., Kim K., Park J.H., Kwon I.C., Jeong S.Y. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting//*Biomaterials*. 2010. Vol.31, P. 106-114.
10. Choi K.Y., Min K.H., Na J.H., Choi K., Kim K., Park J.H., Kwon I. C., Jeong S.Y. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution//*J. Mater. Chem.* 2009. Vol. 19, P. 4102-4107.
11. Zheng, Z.Y., Wang, S.Z., Li G.S., Zhan X.B., Lin C.C., Wu J.R., Zhu L. A new polysialic acid production process based on dual-stage pH control and fed-batch fermentation for higher yield and resulting high molecular weight product//*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97, P. 2405-2412.
12. Gregoriadis G., Fernandes A., Mital M., McCormack B. Polysialic acids: potential in improving the stability and

- pharmacokinetics of proteins and other therapeutics//Cell. Mol. Life Sci.: CMLS. 2000. Vol. 57, P. 1964-1969.
13. Kim J.H., Kim Y.S., Kim S., Park J.H., Kim K., Choi K., Chung H., Jeong, S.Y., Park, R. W., Kim, I.S., Kwon I.C. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel//J. Controll. Release. 2006. Vol. 111, P. 228-234.
14. Biswas, S., Torchilin V.P. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer//Adv. Drug Deliv. Rev. 2014. Vol. 66, P. 26-41.
15. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect//Adv. Drug Deliv. Rev. 2011. Vol.63, P. 131-135.

UDC 616-006.6, BBC 55.6

## UPCONVERSION NANOPARTICLES FOR MALIGNANT NEOPLASMS TREATMENT

**Y.Machkova<sup>1,2</sup>, N.Sholina<sup>1</sup>, Y.Khochenkova<sup>1</sup>, D.Khochenkov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> RUDN University, Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya, 10/2

<sup>2</sup> N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Russia, 115478, Moscow, Kashirskoe shosse, 24

Upconversion nanoparticles (UCNPs) represent a new class of nanomaterials that have great potential for use in experimental and clinical oncology. The main feature of UCNPs is ability to convert the infrared radiation (IR), penetrating relatively deep into the tissues of organisms (1-1.5 cm), into visible and ultraviolet (UV) light, inducing the formation of reactive oxygen species (ROS), that can be used for photodynamic therapy (PDT) of malignant neoplasms. In this report, we demonstrate the possibility of PDT of human melanoma using UCNPs covered with biocompatible coatings. It is shown that activation of UCNPs, captured by tumor cells, by 975 nm laser irradiation causes photons upconversion into UV radiation that induces the formation of ROS. Injection and activation of UCNPs led to significant inhibition of human melanoma growth (TGI = 80% ± 5%) in nude mice.

**Key words:** upconversion nanoparticles, human melanoma, apoptosis, photodynamic therapy, tumor xenografts

Upconversion nanoparticles (UCNPs), or nanoscale anti-Stokes phosphors, are inorganic crystals of sodium tetrafluoroyttriate (NaYF<sub>4</sub>), with a core/shell structure. The core is β-NaYF<sub>4</sub> doped with lanthanide transition metals: ytterbium (Yb<sup>3+</sup>), thulium (Tm<sup>3+</sup>) and erbium (Er<sup>3+</sup>). The crystal shell consists of undoped NaYF<sub>4</sub> [1-3]. Upconversion phosphors are monodisperse nanoparticles in the size range from 15 to 200 nm, having the conversion coefficient, defined as the ratio of radiated power to absorbed power, up to 9%. Depending on the ratio of lanthanides in cores of UCNPs, the 975-nm laser irradiation induces anti-Stokes photoluminescence with emission lines in the red, green, blue or UV spectral regions. An important element of the UCNPs structure, determining their efficiency of passive penetration into the tumor from the circulatory system, and reducing uptake by the immune cells (macrophages, monocytes, dendritic cells), is biocompatible coatings. The most common compound for making coatings is polyethylene glycol and its derivatives [4-6]. However, recent studies have shown that PEG-based nanoparticles can induce hypersensitivity reaction, activate the complement system and the secretion of antibodies against PEG. Thereby, polysaccharides, such as neuraminic acids (NAA), are considered to be promising carriers due to their hydrophilic nature, biodegradability and biocompatibility [7-12]. In fast-growing solid tumors, particularly in melanoma, the vascularization is disorganized. Owing to the pathophysiological difference between tumor and normal tissues: deficiency of lymphatic drainage, extensive fibrosis and dense extracellular matrix – nanoparticles measuring 10 to 200 nm in size can leave blood vessels and accumulate in the interstitial space of tumors. This phenomenon of selective extravasation and retention of macromolecules/nanoparticles inside tumors was called the EPR-effect (permeability and retention effect). Passive delivery through the EPR effect, in intravenous administration, allows to minimize the penetration of UCNPs into normal tissues and their endocytosis by liver and spleen macrophages that comparatively prolongs the circulation time [13-15].

In the study with UCNPs of various types of rhodamine-labeled polymeric coatings (only PMAO, PMAO + PEG, PMAO + NAA), using flow cytometry and confocal microscopy, we compared the efficiency of UCNPs endocytosis by mouse macrophages RAW264.7 (Fig. 1 and 2). It was found that UCNPs with a coating of PEG were increasingly exposed to internalization (over 95% of cells), a lesser extent - of NAA (less than 25% of cells). The average result was shown by UCNPs with coating of PMAO (about 70%).



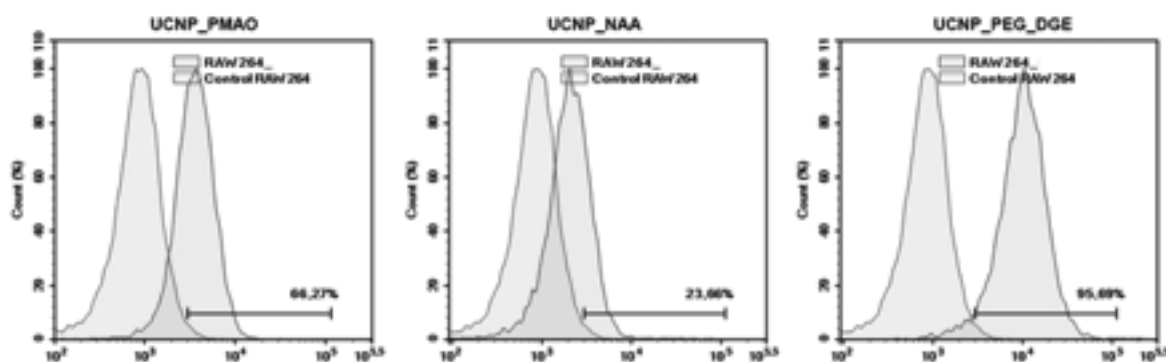


Fig.1. Flow cytometry analysis of the efficiency of UCNPs endocytosis by mouse macrophages RAW264.7 depending on the type of rhodamine-labeled polymeric coatings

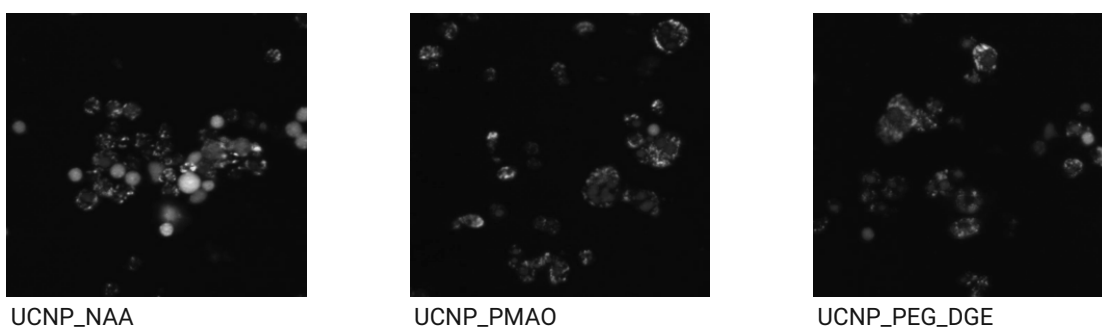


Fig.2. Confocal microscopy study of the efficiency of UCNPs endocytosis by mouse macrophages RAW264.7: rhodamine-labeled UCNPs (red); calcein-AM- labeled mouse macrophages RAW264.1 (green); Hoechst33258 - labeled cell nuclei (blue)

To determine the mechanism of death of A375 melanoma cells under the influence of UCNPs, we controlled the induction of reactive oxygen species (ROS) in the cytoplasm of cells upon administration of nanoparticles and excitation with a 975 nm laser at a dose of 1200 J/cm<sup>2</sup> using a fluorescent probe for ROS - CellROX DeepRed (Thermo). It was demonstrated that upon laser excitation of UCNPs, captured by A375 human melanoma cells, a large amount of ROS was formed in the cells, amplifying the fluorescent signal from the CellROX probe (Fig. 3.). Without UCNPs but in the presence of irradiation (975 nm) induction of ROS did not occur. Thus, the main mechanism of PDT using UCNPs is the induction of ROS.

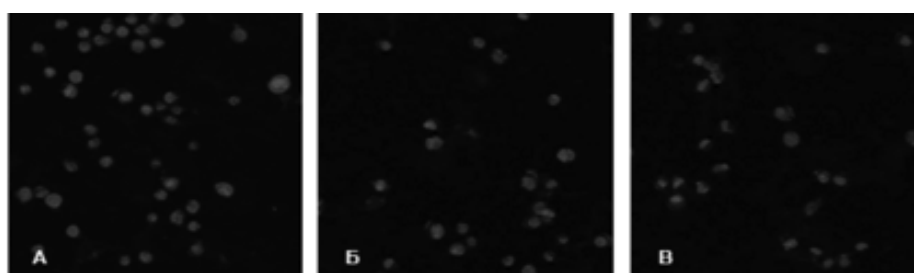
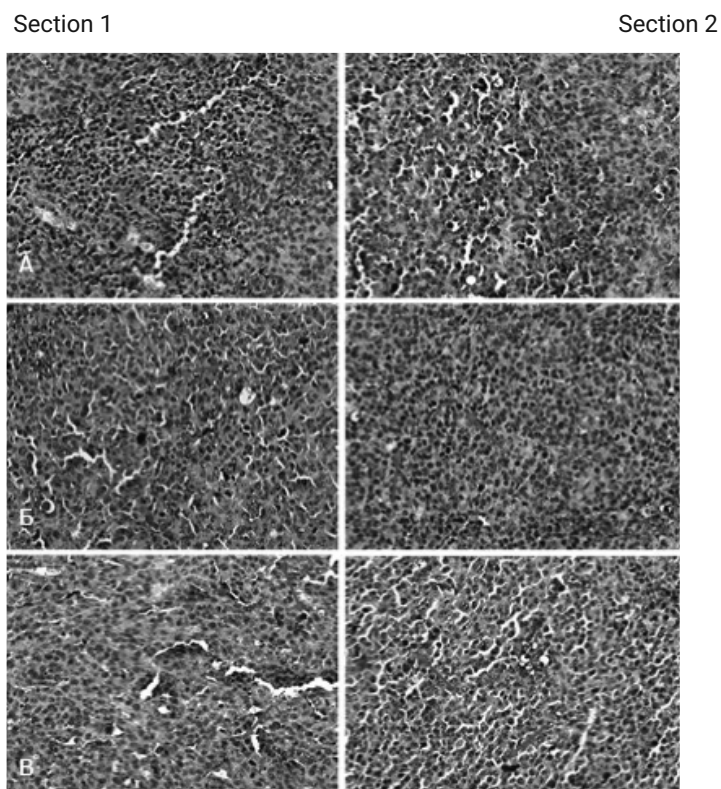


Fig.3. The induction of reactive oxygen species (ROS) in the cytoplasm of A375 melanoma cells using DeepRed CellROX probe: A – UCNPs + 975 nm irradiation; B – 975 nm irradiation; C – control

To study the antitumor activity of UCNPs on human melanoma xenografts (Fig. 4.), A375 cells were subcutaneously transplanted to athymic Balb/c nu/nu mice in an amount of 2×10<sup>6</sup>. As xenografts reached the size of 100 mm<sup>3</sup> we conducted intravenous injection of UCNPs and after 60 minutes irradiated the tumor. Mice were observed for 30 days after irradiation. Activation of UCNPs by 975 nm irradiation led to significant inhibition of tumor growth (TGI = 80% ± 5%) at the end of the observation period (30 days). Histological analysis (TUNEL method, Roche) of tumors in experimental and control groups established an increase in the number of specifically stained apoptotic tumor cells in the experimental group that confirms the efficiency of PDT using UCNPs.



**Fig.4. Apoptosis induction under activated UCNP on A375 melanoma xenografts:**  
A –UV-induced UCNP + 975 nm irradiation; B – 975 nm irradiation only;  
C – UV-free UCNP + 975 nm irradiation

References:

1. Page R.H., Schaffers K.I., Waide P.A., Tassano J.B., Payne S.A., Krupke W.F., Bischel W.K. Upconversion-pumped luminescence efficiency of rare-earth-doped hosts sensitized with trivalent ytterbium//*Journal of the Optical Society of America B-Optical Physics*, 1998. Vol. 15, P. 996-1008
2. Yi G.S., Sun B.Q., Yang F.Z., Chen D.P., Zhou Y.X., Cheng J. Synthesis and characterization of high-efficiency nanocrystal up-conversion phosphors: Ytterbium and erbium codoped lanthanum molybdate//*Chem. Mater.* 2002. Vol. 14. P. 2910-4
3. Boyer J-C., Cuccia L.A., Capobianco J.A. Synthesis of Colloidal Upconverting NaYF<sub>4</sub>: Er<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup> and Tm<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup> monodisperse nanocrystals//*Nano Lett.* 2007. Vol. 7(3). P. 847-852
4. Khaydukov E.V., Rocheva V.V., Semchishen V.A., Seminogov V.N., Sokolov V.I., Zvyagin A.V., Akhmanov A.S., Panchenko V.Ya., Nechaev A.V., Generalova A.N., Shekhter A.B. Opticheskaya vizualizatsiya opukholevykh tkaney s primeneniem antistoksovykh nanochastits//*Vestnik Rossiyskogo fonda fundamental'nykh issledovaniy [RFBR Journal]*. 2014 № 4 (84):7-17.
5. Nadort A., Sreenivasan V.K.A., Song Z., Grebenik E.A., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Panchenko V.Ya., Zvyagin A.V. Quantitative imaging of single upconversion nanoparticles in biological tissue.//*PLoS ONE*. 2013. Vol. 8(5): e63292
6. Guller A.E., Generalova A.N., Petersen E.V., Nechaev A.V., Trusova I.A., Landyshev N.N., Zvyagin A.V. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells//*Nano Research*. 2015. Vol.8 (5), P. 1546-1562
7. Judge A., McClintock K., Phelps J.R., MacLachlan I. Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to pegylated liposomes//*Mol. Ther.* 2006. Vol. 13, P. 328-337.
8. Hamad I., Al-Hanbali O., Hunter A.C., Rutt K.J., Andresen T.L., Moghimi S.M. Distinct polymer architecture mediates switching of complement activation pathways at the nanosphere-serum interface: Implications for stealth nanoparticle engineering//*ACS Nano*. 2010. Vol. 4, P. 6629-6638.
9. Choi K. Y., Chung H., Min K.H., Yoon H.Y., Kim K., Park J.H., Kwon I.C., Jeong S.Y. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting//*Biomaterials*. 2010. Vol. 31, P. 106-114.
10. Choi K.Y., Min K.H., Na J.H., Choi K., Kim K., Park J.H., Kwon I. C., Jeong S.Y. Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential drug carrier for cancer therapy: synthesis, characterization, and in vivo biodistribution//*J. Mater. Chem.* 2009. Vol. 19, P. 4102-4107.
11. Zheng, Z.Y., Wang, S.Z., Li G.S., Zhan X.B., Lin C.C., Wu J.R., Zhu L. A new polysialic acid production process based on dual-stage pH control and fed-batch fermentation for higher yield and resulting high molecular weight product//

*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97, P. 2405-2412.

12. Gregoriadis G., Fernandes A., Mital M., McCormack B. Polysialic acids: potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics//*Cell. Mol. Life Sci.: CMLS.* 2000. Vol. 57, P. 1964-1969.

13. Kim J.H., Kim Y.S., Kim S., Park J.H., Kim K., Choi K., Chung H., Jeong, S.Y., Park, R. W., Kim, I.S., Kwon I.C. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles as carriers for paclitaxel//*J. Controll. Release.* 2006. Vol. 111, P. 228-234.

14. Biswas, S., Torchilin V.P. Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer//*Adv. Drug Deliv. Rev.* 2014. Vol. 66, P. 26-41.

15. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect//*Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. Vol.63, P. 131-135.

УДК 57.088.1

## АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ВЫСОХШИХ МИКРОКАПЕЛЬ ИЗ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА

Михеев А.Ю., Морозов В.Н.

ФГБНУ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г.Пушино, Московская область, Россия.

142290, г. Пушино, ул. Институтская, 3.

e-mail: 2miheev@gmail.com

Предложен новый метод изучения микрокапель легочной жидкости, основанный на сочетании электростатического сбора или сбора импактором микрокапель и исследованием сухих остатков методом атомно-силовой микроскопии.

**Ключевые слова:** легочная жидкость, сухие остатки, атомно-силовая микроскопия, выдыхаемый воздух.

Для диагностики легочных заболеваний необходим анализ биомаркеров заболевания, содержащихся в легочной жидкости. Неинвазивный способ получения легочной жидкости заключается в сборе субмикронных капель легочной жидкости из выдыхаемого воздуха. Мы разработали два метода для сбора индивидуальных выдыхаемых микрокапель. В первом методе используется электростатическая преципитация сухих остатков микрокапель (СОМ) после их зарядки продуктами коронного разряда. В специальном сконструированном нами устройстве СОМы заряжались в коронном разряде и осаждались в электрическом поле на поверхность высокоориентированного пиролитического графита. Были определены оптимальные режимы сбора по скорости потока воздуха (0.15 л/мин) и по току разряда (100 нА), обеспечивающие эффективность сбора более 90% СОМов в объеме. В другом методе микрокапли и СОМы собирали методом импакции из потока воздуха. Была определена оптимальная температура поверхности и температура резервуара, в который собирали выдыхаемый воздух перед сбором на импакторе (50 °С и 20 °С, соответственно).

Полученные образцы собранных сухих остатков выдыхаемых микрокапель были изучены с использованием атомно силового микроскопа в неконтактной моде. Сухие остатки представляют собой комки неправильной формы с неоднородной структурой, высотой 200-500 нм. Изменения формы сухих остатков при выдерживании во влажной атмосфере и в парах хлороформа, а также при их нагревании позволили сделать выводы о строении сухих остатков выдыхаемого воздуха и их возможном химическом составе (наличии в их составе солей – КСl и NH<sub>4</sub>Cl, белков и липидов). Эти данные в комбинации с данными по измерению концентрации капель в выдыхаемом воздухе с помощью лазерного счетчика частиц были использованы для оценки содержания нелетучего материала в выдыхаемом воздухе ( не более 100 пг в литре выдыхаемого воздуха).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-15-00086.

Литература:

1. Morozov V.N., Mikheev A.Y. A collection system for dry solid residues from exhaled breath for analysis via atomic force microscopy//*J. Breath Res.* 2017.Vol.11.P.1-11.

UDC 57.088.1

## ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF DRY RESIDUES OF MICRODROPLETS FROM EXHALED AIR.

Mikheev A.Y., Morozov V.N.

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia.  
e-mail: 2miheev@gmail.com*

A new method for studying microdroplets of lung liquid based on the combination of microdroplet collection by electrostatic method or by impactor and scanning of dry residues by the AFM.

Keywords: lung liquid, dry residues, atomic force microscopy, exhaled air.

Exhaled air contains submicron droplets of lung liquid, which bear biomarkers of pulmonary diseases. We have developed two methods and devices for collecting individual exhaled microdroplets and their dry residues: electrostatic precipitator and impactor. In the first technique dry residues were charged in a corona discharge and electrostatically deposited onto a grounded conducting surface of a highly oriented pyrolytic graphite. Under optimal conditions (volume rate of 0,15 L/min and a current of about 100 nA) more than 90% of all particles were collected in the precipitator. We also optimized collection of microdroplets and dry residues in the impactor in terms of the surface temperature and the temperature of the reservoir where the exhaled air was prepared for impactation (the optimal temperatures were found to be 50°C and 20°C, respectively).

The collected dry residues of exhaled microdroplets were studied using atomic force microscopy in the tapping mode. Dry residues were images as globules of irregular shape with an inhomogeneous internal structure, 200-500 nm in height. Changes in the shape of dry residues after exposure to humid air and chloroform vapor, and after heating led us to some conclusions concerning their internal structure and chemical composition (presence of salts - KCl and NH<sub>4</sub>Cl, proteins and lipids). These measurements combined with measurements of concentration of exhaled droplets with a laser particle counter enabled estimation of concentration of nonvolatile material in the exhaled air, which did not exceed 100 pg/L.

The authors acknowledge funding from the Russian Science Foundation (Grant No. 15-15-00086).

### References:

1. Morozov V.N., Mikheev A.Y. A collection system for dry solid residues from exhaled breath for analysis via atomic force microscopy//J. Breath Res. 2017.Vol.11.P.1-11.

УДК 620.3, ВВС 28.07

## БИОРЕАКТИВНОСТЬ НАНОЧАСТИЦ ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С БЕЛКАМИ

В.В.Панченко <sup>1</sup>, А.М.Стойнова <sup>2</sup>, П.В.Маков <sup>2</sup>, Я.М.Станишевский <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, Россия, 115035, Москва, Садовническая, 47, sus94lik@yandex.ru, +79165997754

<sup>2</sup> Институт биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, Россия, 117198, Москва, Миклухо-Маклая, 10 к 2, stoinova17@mail.ru, +79252705552

Взаимодействие наночастиц с белками основано на биореактивности наночастиц. Это взаимодействие приводит к образованию динамической короны наночастица-белок. Корона белка может влиять на поглощение, воспаление, накопление, деградацию и очищение наночастиц. Кроме того, поверхность наночастиц может вызывать конформационные изменения в адсорбированных белковых молекулах.

**Ключевые слова:** наночастицы, комплекс NP-PC, конъюгаты наночастица-белок

Наночастицы (NPs) обладают уникальными свойствами, которые могут быть полезны в самых разных областях применения. В частности, ведутся исследования в биомедицинской области, интенсивно разрабатываются нановакцины и нанопрепараты. Тем не менее, все большее число исследований показывает отрицательное действие наноматериалов в клеточных системах *in vitro*. В биологической среде

NPs могут взаимодействовать с биомолекулами, такими как: белки, нуклеиновые кислоты, липиды и даже биологические метаболиты из-за их наноразмеров и большого отношения поверхности к массе. Образование комплексов наночастица-белок обычно называют коронацией (NP-PC). Адсорбции белков на нано-биоинтерфейсе помогают водородные связи, силы сольватации, взаимодействия Ван-дер-Ваальса и т. д. Определенные скорости ассоциации и диссоциации для каждого белка определяют долговечность их взаимодействия с поверхностью NP. Необратимое (или долгосрочное) связывание белков на NP приводит к образованию «твердой короны», тогда как быстрое обратимое связывание белков с быстрым обменным курсом образует «мягкую корону» [1, 6]. Было показано, что у разных типов клеток кинетика поглощения одного и того же наноматериала будет отличаться. Адсорбция белков на поверхности NPs может произойти мгновенно. Поэтому можно предположить, что взаимодействие наночастиц с клеточными структурами является косвенным и происходит в основном через белковую корону наночастицы, а не напрямую с поверхностью наночастиц (Рисунок 1).

На клеточном уровне после фагоцитирования моноцитом наночастица может быть взята в эндосому, которая в конечном счете сливается с лизосомой [2, 5, 7]. Все это может привести к тому, что NP подвергнется сложной последовательной модификации, механизмы которой до сих пор полностью не изучены. Способ, с помощью которого молекулы белка располагаются на поверхности NPs, может влиять на биологическую реакционную способность последнего на клеточном уровне [3]. Показано, что плазменные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин и трансферрин, адсорбируются монослойным способом на поверхности наночастиц железа-платины [4]. В то время как бычий сывороточный альбумин (БСА) адсорбируется на поверхности оксида алюминия в виде монослоя, используя 30-36% его общего отрицательного заряда, а дополнительные молекулы БСА из среды связываются с этим монослоем в виде димеров [8]. Поверхность наночастицы может изменять структуру и, следовательно, функцию адсорбированного белка, влияя, таким образом, на общую биореактивность NPs. Изогнутые поверхности наночастиц по сравнению с плоскими поверхностями обеспечивают дополнительную гибкость и увеличение площади поверхности адсорбированных белковых молекул, а также могут влиять на вторичные структуры белков и в некоторых случаях вызывать необратимые изменения [10,11]. Поверхность наночастиц может вызывать аномальное разворачивание связанных белков с образованием новых конформационных эпитопов или индуцировать развёртывание нативной структуры белка для обнаружения скрытых эпитопов (рисунок 2).

Таким образом, на данный момент исследования показывают, что размер, форма и поверхностные характеристики NPs влияют на адсорбцию белка, а также способны модифицировать структуру адсорбированных белковых молекул. Образующийся комплекс наночастица-белок может влиять на биологическую реактивность наночастиц.

#### Литература:

1. Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggard T, Donnelly S, Cagney G, Linse S, Dawson K: Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chem Int Ed* 2007, 46:5754–5756.
2. Cho WS, Duffin R, Howie SEM, Scotton CJ, Wallace WAH, MacNee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K: Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn<sup>2+</sup> dissolution inside lysosomes. *Particle and Fibre Toxicology* 2011, 8:27.
3. Ge C, Du J, Zhao L, Wang L, Liu Y, Li D, Yang Y, Zhou R, Zhao Y, Chai Z, Chen C: Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2011, 108:16968–16973.
4. Jiang X, Weise S, Hafner M, Rocker C, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU: Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *J Royal Soc Interface* 2009, 7:S5–S13.
5. Kreuter J: Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood–brain barrier (BBB). *J Microencapsul* 2013, 30:49–54.
6. Landsiedel R, et al: Testing Metal-Oxide Nanomaterials for Human Safety. *Adv Mater* 2010, 22:2601–2627.
7. Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Åberg C, Dawson KA, Salvati A: Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. *ACS Nano* 2012, 6:5845–5857.
8. Rezwan K, Meier LP, Rezwan M, Vörös J, Textor M, Gauckler LJ: Bovine Serum Albumin Adsorption onto Colloidal Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Particles: A New Model Based on Zeta Potential and UV–vis Measurements. *Langmuir* 2004, 20:10055–10061.
9. Shrutti R, Saptarshi, Albert Duschl and Andreas L Lopata: Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology* 2013, 11:26
10. Verma A, Stellacci F: Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small* 2010, 6:12–21.
11. Worrall JWE, Verma A, Yan HH, Rotello VM: “Cleaning” of nanoparticle inhibitors via proteolysis of adsorbed proteins. *Chem Commun* 2006, 0:2338–2340.

UDC 620.3, BBC 28.07

## BIOREACTIVITY OF NANOPARTICLES AND THEIR INTERACTION WITH PROTEINS

V.Panchenko <sup>1</sup>, .Stoynova <sup>2</sup>, P.Makov <sup>2</sup>, Y.Stanishevsky <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology RUDN, Russia, 115035, Moscow, Sadovnicheskaya street, 47

<sup>2</sup> Institute of Biochemical Technology and Nanotechnology RUDN, Russia, 117198, Moscow, Miklouho-Maclay street, 10k2

The interaction of nanoparticles with proteins is based on the bioreactivity of nanoparticles. This interaction leads to the formation of a dynamic corona of a nanoparticle-protein. The protein corona can affect the absorption, inflammation, accumulation, degradation and purification of nanoparticles. In addition, the surface of nanoparticles can cause conformational changes in adsorbed protein molecules.

**Key words:** nanoparticles, NP-PC complex, nanoparticle-protein conjugates

Nanoparticles (NPs) have unique properties that can be useful in a wide variety of applications. In particular, studies in the biomedical field are underway, nanovaccines and nanopreparations are being intensively developed. Nevertheless, an increasing number of studies show the negative effect of nanomaterials in cellular systems *in vitro*. In a biological environment, NPs can interact with biomolecules, such as: proteins, nucleic acids, lipids and even biological metabolites because of their nanosized surfaces and a large surface-to-mass ratio. The formation of the nanoparticle-protein complexes is usually called coronation (NP-PC). Adsorption of proteins on the nano-bio-interface is helped by hydrogen bonds, solvation forces, Van der Waals interactions, etc. Certain association and dissociation rates for each protein determine the longevity of their interaction with the NP surface. Irreversible (or long-term) binding of proteins to NP leads to the formation of a "hard corona", whereas reversible binding of proteins with a fast exchange rate forms a "soft corona" [1, 6]. It has been shown that for different types of cells, the kinetics of absorption of the same nanomaterial will differ. Adsorption of proteins on the surface of NPs can occur instantaneously. Therefore, it can be assumed that the interaction of nanoparticles with cellular structures is indirect and occurs mainly through the protein corona of nanoparticles (Figure 1).

At the cellular level after phagocytosis by monocyte, the nanoparticle can be introduced into the endosome, which eventually merges with the lysosome [2, 5, 7]. All this can lead to the fact that NP will undergo a complex consecutive modification, the mechanisms of which have not yet been fully studied. The way that protein molecules are located on the surface of NP can influence the biological reactivity of the protein at the cellular level [3]. It is shown that plasma proteins, such as human serum albumin and transferrin, are adsorbed by the monolayer method on the surface of iron-platinum nanoparticles [4]. While bovine serum albumin (BSA) is adsorbed on the surface of alumina as a monolayer, using 30-36% of its total negative charge, and additional BSA molecules from the medium bind to this monolayer as dimmers [8]. The surface of the nanoparticle can change the structure and, therefore, the function of the adsorbed protein, thus affecting the overall bioreactivity of the NPs. Curved surfaces of nanoparticles compared to flat surfaces provide additional flexibility and an increase in the surface area of adsorbed protein molecules, and can also affect secondary structures of proteins and in some cases cause irreversible changes [10, 11]. The surface of nanoparticles can cause anomalous unfolding of bound proteins to form new conformational epitopes or cause unfolding of a native protein structure to detect hidden epitopes (Figure 2).

Thus, for the time being, studies show that the size, shape and surface characteristics of NPs affect the adsorption of the protein, and are also capable of modifying the structure of adsorbed protein molecules. The resulting nanoparticle-protein complex can influence the biological reactivity of nanoparticles.

### References:

1. Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggard T, Donnelly S, Cagney G, Linse S, Dawson K: Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew Chem Int Ed* 2007, 46:5754–5756.
2. Cho WS, Duffin R, Howie SEM, Scotton CJ, Wallace WAH, MacNee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K: Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn<sup>2+</sup> dissolution inside lysosomes. *Particle and Fibre Toxicology* 2011, 8:27.
3. Ge C, Du J, Zhao L, Wang L, Liu Y, Li D, Yang Y, Zhou R, Zhao Y, Chai Z, Chen C: Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2011, 108:16968–16973.
4. Jiang X, Weise S, Hafner M, Rocker C, Zhang F, Parak WJ, Nienhaus GU: Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *J Royal Soc Interface* 2009, 7:S5–S13.
5. Kreuter J: Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood–brain barrier (BBB). *J Microencapsul* 2013, 30:49–54.
6. Landsiedel R, et al: Testing

*Metal-Oxide Nanomaterials for Human Safety. Adv Mater 2010, 22:2601–2627. 7. Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Åberg C, Dawson KA, Salvati A: Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. ACS Nano 2012, 6:5845–5857 8. Rezwan K, Meier LP, Rezwan M, Vörös J, Textor M, Gauckler LJ: Bovine Serum Albumin Adsorption onto Colloidal Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Particles: A New Model Based on Zeta Potential and UV–vis Measurements. Langmuir 2004, 20:10055–10061. 9. Shruti R, Saptarshi, Albert Duschl and Andreas L Lopata: Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. Journal of Nanobiotechnology 2013, 11:26 10. Verma A, Stellacci F: Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. Small 2010, 6:12–21. 11. Worrall JWE, Verma A, Yan HH, Rotello VM: “Cleaning” of nanoparticle inhibitors via proteolysis of adsorbed proteins. Chem Commun 2006, 0:2338–2340.*

УДК: 579.6: 615

## БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРОДУЦЕНТОМ GLUCONACETOBACTER HANSENIИ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Громовых Т.И.<sup>1</sup>, Киселева О.И.<sup>2</sup>, Люндуп А.В.<sup>1</sup>, Фельдман Н.Б.<sup>1</sup>, Луценко С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, г. Москва, 119991. Ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 2

e-mail: gromovykh@yandex.ru

Получены различные матрицы бактериальной целлюлозы, синтезируемые продуцентом *Gluconacetobacter hansenii*. при различных условиях культивирования. Показаны эффективные методы освобождения матриц от клеток продуцента и эндотоксинов. Биополимер, освобожденный от эндотоксинов и клеток, не обладает цитотоксичностью.

**Ключевые слова:** бактериальная целлюлоза, *Gluconacetobacter hansenii*, цитотоксичность, наноматериал, эндотоксины

Бактериальная целлюлоза химически идентична целлюлозе растительной, но отличается молекулярной структурой и высокой химической чистотой. В ней отсутствуют примеси лигнина, гемицеллюлоз и остальных различных компонентов, свойственных растительному аналогу. Она характеризуется более высокой эластичностью, модулем прочности на разрыв, сорбционностью, пористостью и, что очень важно для медицины, полной биосовместимостью. Получены различные формы бактериальной целлюлозы, такие как плёнки, трубки, аэрогели, которые активно исследуются учеными. Некоторые из них показывают свое превосходство, в то время, когда многие пленочные материалы бактериальной целлюлозы уже используются в практике [1, 2].

Цель исследований: оценить продуктивность *Gluconacetobacter hansenii* в различных условиях культивирования; разработать методы освобождения матриц бактериальной целлюлозы от клеток и эндотоксинов для направленного использования в медицине.

Получение биополимера бактериальной целлюлозы проводили с использованием штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) [3]. Штамм культивировали на модифицированной нами синтетической среде С. Хестрина и М. Шрамма [4] с различными источниками углерода.

Исследования показали, что морфология синтезируемого продуцентом полимера бактериальной целлюлозы зависит от условий культивирования продуцента. При статическом культивировании получали пленки различной толщины и прочности, при перемешивании – глобулы различного диаметра. Максимальная продуктивность при статическом культивировании продуцента *G. hansenii* на различных источниках углерода составляла от 8,7 до 13,3 г/л а.с.в. При культивировании в режиме перемешивания получали глобулы различного диаметра, при этом максимальная продуктивность была ниже и составила от 4,6 до 7,6 г/л а.с.в.

Одним из важнейших показателей качества медицинских материалов на основе бактериальной целлюлозы является отсутствие в них клеток продуцента и эндотоксинов. Освобождение матриц бактериальной целлюлозы от клеток и эндотоксинов проводили двумя методами: в первом варианте отмыванием в 5 %-м растворе соли додецилсульфат натрия и в растворе RIPA в течение 78 часов с дальнейшим промыванием дистиллированной водой. Во втором способе использовали метод одно-, двух- и трехкратного отмывания жидким CO<sub>2</sub> в реакторе для сверхкритической обработки под давлением 300-500 атм при температуре 40 °С. Контроль присутствия клеток продуцента в матрицах проводили методом атомно-силовой микроскопии и микробиологическим анализом. Определение количества остаточного эндотоксина в пленках бактериальной целлюлозы

проводили согласно требованиям стандартов GMP для пленочных материалов [5, 6] методом гель-тромб теста с помощью лизата амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив, Limus AmebocyteLysate, Reagent, U.S. License No 1197, Charles River Endosafe, США). Результаты исследований показали более высокую эффективность освобождения пленочных и сферических матриц бактериальной целлюлозы методом отмывания раствором RIPA. При таком методе обработки количество эндотоксина отвечает требованиям стандарта GMP для медицинских покровных материалов.

Оценку токсичности пленок бактериальной целлюлозы проводили с применением колориметрического - МТТ-теста и клеточного анализатора iCelligence (ACEA, США). Исследования показали отсутствие цитотоксичности образцов бактериальной целлюлозы, отмывтых додецилсульфатом натрия и раствором RIPA, в то время как матрицы бактериальной целлюлозы, отмывтые в суперкритическом растворе CO<sub>2</sub>, показывали незначительную токсичность.

Проведены исследования по способности к адгезии клеток прокариот и эукариот у разработанных матриц бактериальной целлюлозы.

#### Литература:

1. Sulaeva I., Henniges U., Rosenau Th., Potthast A. // *Biotechnology Advances*. 2015. Volume 33, Issue 8, December 2015, pp. 1547-1571.
2. .Khairullin, A.R., Temnikova, N.E., and Pautov, V.D.//*Vestn. Kazan. Tekhnol. Univ.*, 2013, vol. 16, no. 2, pp. 89–91.
3. Патент РФ. 2012. № 2464307.
4. Hestrin S., Schrammann M. //*Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum 2. Preparation of freeze-drie cells capable of polymerizing glucose to cellulose// Biochemical Journal*. 1952. V 58. №2. - pp.345-352.
5. *Bacterial Endotoxin test «85»*. In *The U.S. Pharmacopeia*. 23rd rev. Mask Publishining Co., Easton PA, 1995.
6. *US (June 2012) Guidance for industry—pyrogen and endotoxins testing*. In: *Services USDoHH (ed). U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, p 11.*

UDC: 579.6: 615

## BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE BY PRODUCENT GLUCONACETOBACTER HANSENI FOR DIRECT USE IN MEDICINE

Gromovkyh T.I. <sup>1</sup>, Kiselyova O.I. <sup>2</sup>, Lundup F.V. <sup>1</sup>, Feldman N.B. <sup>1</sup>, Lutsenko S.V. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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), 119991, Moscow, Trubetskaya st.,8/2

<sup>2</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Leninskie gory, 1/2  
e-mail: gromovkykhtatyana@mail.ru

Various bacterial cellulose matrices synthesized by the producer of *Gluconacetobacter hansenii* under various cultivation conditions were obtained. Effective methods for releasing matrices from producer cells and endotoxins are shown. The biopolymer released from endotoxins and cells does not have cytotoxicity.

**Key words:** bacterial cellulose, *Gluconacetobacter hansenii*, cytotoxicity, nanomaterial, endotoxins

Bacterial cellulose is chemically identical to plant cellulose, but has a molecular structure and high chemical purity. It does not contain impurities of lignin, hemicelluloses and other various components inherent in the plant analogue. It is characterized by a higher elasticity, a tensile strength modulus, sorption capacity, porosity and, which is very important for medicine, full biocompatibility. Various forms have been obtained, such as films, tubes, aerogels and other 3-d bacterial cellulose structures, which are actively studied by scientists. Some of them show their superiority, at a time when many film materials of bacterial cellulose are already used in practice [1, 2]. Various forms of bacterial cellulose, such as films, tubes, aerogels, which are actively studied by scientists, are obtained. Some of them show their superiority, at a time when many film materials of bacterial cellulose are already used in practice [1, 2].

Objective: to evaluate the productivity of *Gluconacetobacter hansenii* under various cultivation conditions; to develop methods for the release of bacterial cellulose matrices from cells and endotoxins for directed use in medicine.

Preparation of biopolymer bacterial cellulose was carried out using the strain *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (VKPM B-10547) [3]. The strain was cultured on the modified synthetic medium of S. Hestrin and M. Shramm [4] with various sources of carbon.

Studies have shown that the morphology of the bacterial cellulose synthesized by the polymer producer



depends on the cultivation conditions of the producer. In the static culture, films of different thickness and strength were obtained, with mixing, globules of different diameters. The maximum productivity in the static cultivation of the producer of *G. hansenii* at various carbon sources was from 8.7 to 13.3 g / l of as.v. When culturing in the mixing regime, globules of different diameters were obtained, with the maximum productivity being lower and ranging from 4.6 to 7.6 g / l of absolutely dry weight.

One of the most important indicators of the quality of medical materials on the basis of bacterial cellulose is the absence in them of producer cells and endotoxins. The release of bacterial cellulose matrices from cells and endotoxins was carried out in two ways: in the first variant, by washing in a 5% solution of sodium dodecylsulfate and in RIPA solution for 78 hours with further washing with distilled water. In the second method, the method of one-, two- and three-time washing with liquid CO<sub>2</sub> in a reactor for supercritical treatment at a pressure of 300-500 atm at a temperature of 40 ° C was used.

Control of the presence of producer cells in matrices was carried out by atomic force microscopy and microbiological analysis. The determination of the amount of residual endotoxin in bacterial cellulose films was carried out according to the requirements of GMP standards for film materials [5, 6] by gel-thromb test using *Limulus polyphemus* lysate amoebocyte lysate (LAL reagent, Limus Amoebocyte Lysate, Reagent, US License No. 1197, Charles River Endosafe, USA). The results of the studies showed a higher efficiency of release of film and spherical matrices of bacterial cellulose by washing with RIPA solution. With this treatment method, the amount of endotoxin meets the requirements of the standard GMP for medical coating materials.

The toxicity of the bacterial cellulose films was assessed using a colorimetric MTT test and the iCelligence cell analyzer (ACEA, USA). Studies showed no cytotoxicity of bacterial cellulose samples washed with sodium dodecyl sulfate and RIPA solution, while bacterial cellulose matrices washed in supercritical CO<sub>2</sub> solution showed little toxicity.

Studies have been carried out on the ability of the cells of prokaryotes and eukaryotes to adhere in the developed bacterial cellulose matrices.

#### References:

1. Sulaeva I., Henniges U., Rosenau Th., Potthast A. // *Biotechnology Advances*. 2015. Volume 33, Issue 8, December 2015, pp. 1547-1571.
2. Khairullin, A.R., Temnikova, N.E., and Pautov, V.D.//*Vestn. Kazan. Tekhnol. Univ.*, 2013, vol. 16, no. 2, pp. 89–91.
3. *The patent of the Russian Federation*. 2012. No. 2464307.
4. Hestrin S., Schramann M. //*Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose*// *Biochemical Journal*. 1952. V 58. №2. - pp.345-352.
5. *Bacterial Endotoxin test «85»*. In *The U.S. Pharmacopeia*. 23rd rev. Mack Publishing Co., Easton PA, 1995.
6. *US (June 2012) Guidance for industry—pyrogen and endotoxins testing*. In: *Services USDoHH (ed)*. U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, p 11.

УДК 577.114.4:606

## БИОСОВМЕСТИМЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Черногорцева М.В.<sup>1</sup>, Кильдеева Н.Р.<sup>1</sup>, Успенский С.А.<sup>2</sup>, Демина Т.С.<sup>2</sup>, Дроздова М.Г.<sup>3</sup>, Марквичева Е.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство), Москва, Россия, 117997, Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр.1

<sup>2</sup> Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук, Москва, Россия, 117393, Москва, ул. Профсоюзная, д.70

<sup>3</sup> Институт биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10  
e-mail: novissime@mail.ru

Получены и исследованы биополимерные матриксы на основе гиалуроновой кислоты, химически сшитые диглицидиловыми эфирами двухатомных спиртов при различных условиях протекания процесса. Исследованы перспективы использования матриксов для выращивания клеток.

**Ключевые слова:** матриксы; гиалуроновая кислота; 1,4 бутандиол диглицидиловый эфир; цитотоксичность; регенеративная медицина; биополимер.

Гиалуроновая кислота (ГК) – глюкозаминогликан, входящий в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей, это безопасный для организма биополимер животного происхождения, который может

быть получен биотехнологическим способом с использованием бактериальных культур. Благодаря уникальным физико-химическим свойствам, высокой биосовместимости и гидрофильности, использование ГК возможно в разных областях медицины: ГК способствует регенерации эпителия, предотвращает образование грануляционных тканей, способствует рубцеванию трофических язв. В натуральном виде ГК представляет собой соль (гиалуронат), которая хорошо растворима в воде во всем диапазоне pH с образованием высоковязких растворов. Для успешного применения ГК в медицине требуется модификация биополимера, в частности образование трехмерной молекулярной сетки поперечно-сшитых гидрогелей [1]. Такая модификация может быть достигнута путем использования диглицидиловых эфиров двухатомных спиртов которые могут одинаково хорошо реагировать как с первичными, так и с вторичными гидроксильными группами каждого гликопирозного звена ГК [2]. Реакция сшивки диэпоксидными соединениями протекает в щелочной или кислой среде при минимальном содержании воды, в таких условиях можно получить гидрогель способный к набуханию не менее 1000%, высокопористый матрикс может быть получен из этого гидрогеля методом сублимационной сушки. На основании литературных данных [3] были выбраны условия получения гидрогелей ГК путем химической сшивки 1,4 бутандиол диглицидилового эфира (БДДЕ), в щелочной среде. Проведение реакции сшивки привело к созданию жестких структурированных гелей степень набухания которых находится в диапазоне от 1800% до 4000%. Было установлено влияние соотношения БДДЕ/ГК моль/моль, на степень набухания и модуль упругости сшитых гелей, выявлено, что увеличение соотношения свыше 0,15 не приводит к снижению параметров гидрогеля, определяемых степенью сшивки. Так же, разработан метод получения высокопористых матриксов на основе ГК путем сублимационной сушки набухших гидрогелей. Для улучшения остеокондуктивных свойств полученных матриксов ГК, был использован гидроксиапатит. Исследование цитотоксичности полученных матриксов ГК на примере культуры фибробластов L929 *in vitro* показало высокую биологическую совместимость и пролиферацию фибробластов. Матрикс ГК, содержащие 10% гидроксиапатита, так же не обладали цитотоксичностью и обеспечивали более высокую адгезионную способность и биологическую совместимость по сравнению с матриксом ГК без гидроксиапатита, что делает данный материал перспективным для использования в качестве подложки для выращивания клеток используемых в тканевой и костной реконструкции.

Литература:

- [1] Понеделькина И.Ю., Лукина Е.С. Кислые гликозаминогликаны и их химическая модификация // *Биорг. хим.* - 2008. - Т. 34. №1. - С. 5-28
- [2] Stella J.A., D'Amore A., Wagner W.R. On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues // *Acta. Biomater.* 2010. Vol. 6 №7. P. 2365–2381
- [3] Biao Yanga M.S., Xueping G. Determination of modification degree in BDDE modified hyaluronic acid hydrogel by SEC // *Carbohydrate Polymers.* 2015. Vol. 131. P. 233-239

УДК 577.114.4:606

## BIOCOMPATIBLE MATRICES BASED ON HYALURONIC ACID FOR REGENERATIVE MEDICINE

Chernogortseva M.V.<sup>1</sup>, Kildeeva N.R.<sup>1</sup>, Uspenskii S.A.<sup>2</sup>, Demina T.S.<sup>2</sup>, Drozdova M.G.<sup>3</sup>, Markvicheva E.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Russian State University. A.N. Kosygin (Technologies, Design, Art), Moscow, Russia, 117997, Moscow, ul. Sadovnicheskaya, 33, building 1

<sup>2</sup> Institute of Synthetic Polymer Materials. N.S. Enikolopov Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 117393, Moscow, ul. Profsoyuznaya, 70

<sup>3</sup> Institute of Bioorganic Chemistry. acad. M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikova Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 117997, Moscow, GSP-7, ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10  
e-mail: novissime@mail.ru

Biopolymer matrices based on hyaluronic acid chemically crosslinked with diglycidyl ethers of dihydric alcohols under various process conditions were obtained and investigated. The prospects of using matrices for growing cells have been investigated.

**Key words:** matrices; hyaluronic acid; 1,4 butanediol diglycidyl ether; cytotoxicity; regenerative medicine; biopolymer.

Hyaluronic acid (HA) - glucosaminoglycan, which is part of the connective, epithelial and nerve tissue, is a biopolymer of animal origin safe for the body, which can be obtained biotechnologically using bacterial cultures.

Due to its unique physico-chemical properties, high biocompatibility and hydrophilicity, the use of HA is possible in different fields of medicine: HA promotes the regeneration of the epithelium, prevents the formation of granulation tissues, and helps cicatrize trophic ulcers. In its natural form, HA is a salt (hyaluronate), which is highly soluble in water over the entire pH range with the formation of highly viscous solutions. For the successful use of HA in medicine, a modification of the biopolymer is required, in particular the formation of a three-dimensional molecular network of cross-linked hydrogels [1]. Such a modification can be achieved by using diglycidyl ethers of dihydric alcohols, which can respond equally well to both primary and secondary hydroxyl groups of each glycopyranose HA link [2]. The reaction of cross-linking with diepoxy compounds proceeds in an alkaline or acidic medium with a minimum volume of water, under such conditions a hydrogel capable of swelling of at least 1000% can be obtained, a high porosity matrix can be obtained from this hydrogel by freeze drying. Based on the literature data [3], the conditions for obtaining hydrogels of HA after chemical cross-linking of 1,4 butanediol diglycidyl ether (BDDE), in an alkaline medium, were chosen. The crosslinking reaction resulted in the creation of rigid structured swelling gels ranging from 1800% to 4000%. The effect of BDDE / HK mole / mole on the degree of swelling and modulus of elasticity of crosslinked gels was found, an increase in the cost of more than 0.15 did not lead to satisfaction of the hydrogel determined by the degree of crosslinking. Also, a method has been developed for obtaining high porosity matrices based on HA by freeze drying swollen hydrogels. To improve the osteoconductive properties of the HA matrix, hydroxyapatite was selected. A study of cytotoxicity in HA matrix using the example of the L929 fibroblast culture in vitro showed high biological compatibility and proliferation of fibroblasts. HA matrices containing 10% hydroxyapatite also did not have cytotoxicity and provided higher adhesion and biocompatibility compared to the GC matrix without hydroxyapatite, which makes this material promising for use as a substrate for growing cells in tissue and bone reconstruction.

#### References:

- [1] Ponedentkina I.Yu., Lukina E.S. *Acid glucosaminoglycans and their chemical modification // Bioorg. chem.* - 2008. - Т. 34. №1. - P. 5-28
- [2] Stella J.A., D'Amore A., Wagner W.R. *On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues // Acta. Biomater.* 2010. Vol. 6 №7. P. 2365–2381
- [3] Biao Yanga M.S., Xueping G. *Determination of modification degree in BDDE modified hyaluronic acid hydrogel by SEC // Carbohydrate Polymers.* 2015. Vol. 131. P. 233-239

## БИОСОМЕСТИМЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ СОПОЛИМЕРОВ N-ВИНИЛ-2-ПИРРОЛИДОНА КАК СИСТЕМА ВВЕДЕНИЯ И ДОСТАВКИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Куликов П.П., Кусков А.Н., Лусс АЛ., Горячая А.В., Штильман М.И.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
 125047, Москва, Миусская пл., д. 9  
 e-mail: p.kulikov.p@gmail.com

Были разработаны амфифильные сополимеры на основе N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты, комплексно связанные с ионами гадолиния, и подобраны оптимальные условия для формирования наночастиц на основе полученных полимерных металлокомплексов.

**Ключевые слова:** амфифильный сополимер; наночастица; N-винил-2-пирролидон, акриловая кислота, гадолиний.

Благодаря своей структуре (присутствие гидрофильного и гидрофобного фрагментов в молекуле), амфифильные сополимеры на основе N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты способны к самоагрегации в водных растворах с образованием различных мицеллярных структур. Наличие гидрофобного ядра у таких структур обуславливает возможность включения в него широкого спектра водонерастворимых биологически активных веществ [1] тем самым, увеличивая их растворимость и биодоступность. Комплексообразование между атомами азота пирролидинового кольца, карбоксильными группами и ионами гадолиния [2] в наноносителе на основе сополимеров, позволит использовать данные системы как многофункциональное контрастное вещество при МРТ-исследовании in vivo.

Были синтезированы амфифильные сополимеры N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты (содер-

жание акриловых звеньев ~5 мольн. %) методом радикальной сополимеризации N-винил-2-пирролидона и акриловой кислоты в присутствии инициатора радикальной полимеризации азобисизобутилонитрила с использованием в качестве передатчика и одновременно регулятора роста цепи октадецилмеркаптана. Полученные полимеры очищали диализом против воды. Полимерные металлокомплексы получали путем инкубации раствора очищенного сополимера с избытком хлорида гадолиния. Амфифильные полимерные металлокомплексы с гадолинием были охарактеризованы по следующим параметрам: средний размер образующихся частиц, ζ-потенциал, количество комплексно связанного гадолиния.

В итоге были подобраны оптимальные условия для формирования полимерных наночастиц с гидрофобным ядром и гидрофильной поверхностью, с которой комплексно связаны ионы гадолиния.

Работа Кускова А.Н. поддержана внутренним инициативным грантом РХТУ им. Д.И. Менделеева. Номер проекта 009-2018.

Работа Куликова П.П. поддержана грантом РФФИ № 18-34-00812.

Литература:

1. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Goryachaya A.V., Tzatzarakis M.N., Docea A.O., Velonia K., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M.

*Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal, anti-inflammatory drugs: In vitro cytotoxicity and in vivo acute toxicity study // Nanomedicine: NBM. 2017. V. 13(3). P. 1021-1030.*

2. Кусков А.Н., Куликов П.П., Штильман М.И., Ананьев В.В., Аксенова Т.И. Амфифильные полимерные металлокомплексы и способ их получения: патент РФ 2608304; заявл. 11.09.15; опубл. 17.01.17, Бюл. № 2.

## BIOCOMPATIBLE POLYMERIC NANOPARTICLES BASED ON AMPHIPHILIC COPOLYMERS OF N-VINYL-2-PYRROLIDONE AS A SYSTEM FOR THE INTRODUCTION AND DELIVERY OF DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC SUBSTANCES

**Kulikov P.P., Kuskov A.N., Luss A.L., Goryachaya A.V., Shtilman M.I.**

*D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia*

*125047 Moscow, Miusskaya sq., 9*

*e-mail: p.kulikov.p@gmail.com*

Amphiphilic copolymers based on N-vinyl-2-pyrrolidone and acrylic acid complexed with gadolinium ions have been developed, and optimal conditions for the formation of nanoparticles based on the obtained polymeric metal complexes have been selected.

**Key words:** amphiphilic copolymer; nanoparticle; N-vinyl-2-pyrrolidone, acrylic acid, cytokine gadolinium.

Due to their structure (presence of hydrophilic and hydrophobic fragments in the molecule), amphiphilic copolymers based on N-vinyl-2-pyrrolidone and acrylic acid are capable of self-aggregation in aqueous solutions with the formation of various micellar structures. The presence of a hydrophobic core in such structures makes it possible to include a wide range of water-insoluble biologically active substances [1], thereby increasing their solubility and bioavailability. Complexation between the nitrogen atoms of the pyrrolidone ring, carboxyl groups and gadolinium ions [2] in copolymer-based nanocarriers will allow application of these systems as a multifunctional contrast agent in MRI in vivo studies.

Amphiphilic copolymers of N-vinyl-2-pyrrolidone and acrylic acid (~ 5 mole% acrylic units) were synthesized by the radical copolymerization of N-vinyl-2-pyrrolidone and acrylic acid in the presence of the radical polymerization initiator – azobisisobutyronitrile and of the chain growth regulator - octadecylmercaptan . The resulting polymers were purified by dialysis against water. Polymeric metal complexes were obtained by incubating a solution of the purified copolymer with an excess of gadolinium chloride. Amphiphilic polymeric metal complexes with gadolinium were characterized by the following parameters: average particle size, ζ-potential, amount of complex-bound gadolinium.

As a result, optimal conditions were chosen for the formation of polymer nanoparticles with a hydrophobic core and a hydrophilic shell, containing complexly bound gadolinium ions.

The work of Kuskov A.N. is supported by an internal initiative grant from the Russian Chemical Technical University. D.I. Mendeleev University. The project number is 009-2018.

The work of Kulikov P.P. is supported by the RFBR grant No. 18-34-00812.

## References:

1. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Goryachaya A.V., Tzatzarakis M.N., Docea A.O., Velonia K., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M. Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles as carriers for non-steroidal, anti-inflammatory drugs: In vitro cytotoxicity and in vivo acute toxicity study // *Nanomedicine: NBM*. 2017. V. 13(3). P. 1021-1030.
2. Kuskov A.N., Kulikov P.P., Shtilman M.I., Ananiev V.V., Aksenova T.I. Amphiphilic polymeric metal complexes and the method of their production: RU patent 2608304; claimed. 11/09/15; publ. 17.01.17, Bul. № 2.

УДК: 615.032.13

## ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ А-ЛИПОВОЙ КИСЛОТЫ НА КИСЛОРОДНЫЙ ВЗРЫВ НЕЙТРОФИЛОВ

**В.А.Щелконогов<sup>1</sup>, Г.А.Джавадова<sup>1</sup>, Н.С.Шастина<sup>1</sup>, Г.М.Сорокоумова<sup>1</sup>, К.С.Сарвас<sup>2</sup>, А.В.Чеканов<sup>2</sup>, О.А.Баранова<sup>2</sup>, К.Д.Казаринов<sup>3</sup>, Э.Ю.Соловьева<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Московский технологический университет (МИТХТ), Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, д. 86, vasilyy9999@yandex.ru, 89152398500

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1, ,

<sup>3</sup> ФГБУН Институт радиотехники и электроники имени В. А. Котельникова РАН, Россия, 141190, Фрязино, пл. Введенского, д. 1, ,

Изучено взаимодействие липосомальной формы α-липовой кислоты (ЛК) с активными формами кислорода (АФК) при активации нейтрофилов (НФ) форбол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА). На основании НСТ-теста оценено влияние липосом, содержащих ЛК, на накопление супероксид-анион радикала при кислородном взрыве НФ. Методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентного соединения 2,7-дихлорфлуоресцеина (ДФХФ) показано взаимодействие липосом с ЛК с кислородсодержащими радикалами.

**Ключевые слова:** липосомы, α-липовая кислота, нейтрофилы, активные формы кислорода.

Изменение активности нейтрофилов (НФ) – один из факторов, определяющих развитие и прогрессирование патологических процессов, происходящих в организме человека. Избыточное накопление АФК приводит к резкому увеличению метаболической активности НФ, а, в последующем, и к их гибели [1]. Поэтому необходимо снижать активность данных процессов, используя антиоксиданты (АО), а также точно понимать механизмы действия АО.

Цель данной работы является исследование влияния липосомальной формы ЛК на кислородный взрыв нейтрофилов.

Ранее были получены липосомы с ЛК, характеризующиеся эффективностью включения субстанции, равной 85% , и стабильностью при длительном хранении. Также, используя метод лимнол-зависимой хемилюминисценции (ЛХЛ), было показано, что «пустые» фосфатидилхолиновые липосомы (ФХ-липосомы), и в большей степени липосомы с ЛК подавляют образование АФК при активации нейтрофилов ФМА [2].

В данной работе проводились исследования по установлению механизма действия липосомальной формы ЛК и оценивалось её влияние на метаболические процессы, протекающие в НФ. На первом этапе работы была качественно оценена клеточная культура НФ. При окрашивании НФ трипановым синим выживаемость НФ составила 95%. Методом проточной цитометрии с использованием маркеров по CD8, CD16 и CD24 было показано, что в полученных образцах НФ содержалось 0,8 % лимфоцитов и 4,2 % моноцитов.

Для установления механизма действия липосомальной формы ЛК на нейтрофилы т. е. определения, с какими АФК она преимущественно взаимодействует, был проведён тест с п-нитрофенилтетразолий хлоридом - НСТ-тест. Известно, что растворимый НСТ захватывается нейтрофилами и восстанавливается супероксид-анион радикалами (СОАР), образуемыми клетками, до диформаза, который выпадает в клетке в виде синих кристаллов. В результате исследований было обнаружено, что НФ имели незначительную спонтанную активность, обусловленную незначительным содержанием СОАР в клетках. Добавление ФМА к НФ приводило к существенному увеличению образования количества диформаза, т.е. СОАР, вследствие их активации. В свою очередь введение в эту систему «пустых» ФХ-липосом и липосом с ЛК (Слк = 1 мМ) значительно уменьшало образование СОАР. При добавлении водорастворимой формы или этилендиаминовой соли ЛК (Слк = 1 мМ) происходило значительное увеличение количество СОАР. Вполне вероятно, что полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление липосом с ЛК, позволяет ЛК проникнуть в клетку в больших количествах, вследствие чего происходит нейтрализация СОАР. Кроме

того, ненасыщенные липиды, входящие в состав липосом, способны взаимодействовать с СОАР, что также приводит к уменьшению СОАР. Водорастворимая форма и этилендиаминовая соль ЛК, вероятно, проникают в клетку в очень низких количествах и оказывают прооксидантное действие.

На следующем этапе работы оценивалось влияние липосомальной формы ЛК на накопление кислородсодержащих (О-центрированных) радикалов (О-р) в НФ, предварительно активированных ФМА, используя флуоресцентный зонд 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (ДХДФ-ДА). Известно, что ДХДФ-ДА легко проникает через клеточную мембрану и под действием внутриклеточных эстераз деацетилируется с образованием 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина (ДХДФ), который при взаимодействии с О-р (НО<sup>•</sup>, ROO<sup>•</sup> и др.) окисляется с образованием флуоресцирующего соединения 2,7-дихлорфлуоресцеина (ДФ). Интенсивность флуоресценции ДФ регистрировали на проточном цитометре. В результате исследований было показано, что НФ обладают собственным свечением вследствие воздействия на клетки когерентным лазерным излучением ( $\lambda = 488$  нм), которое обусловлено наличием окисленных флавопротеинов. Это свечение значительно увеличивалось в присутствии ФМА. Добавление «пустых» ФХ-липосом вносило вклад в увеличение интенсивности флуоресценции при активации НФ с помощью ФМА, а липосомы с ЛК достоверно подавляли интенсивность флуоресценции клеток. В свою очередь, водорастворимые формы ЛК стимулировали активность НФ, проявляя прооксидантные свойства.

Добавление ДХДФ-ДА и ФМА к нейтрофилам приводило к значительному увеличению интенсивности флуоресценции по сравнению с нативными НФ с этим зондом вследствие образования большого количества кислородсодержащих радикалов. При этом ФХ-липосомы увеличивали интенсивность флуоресценции ДФ при активации НФ действием ФМА, вследствие окисления липидов, входящих в состав липосом. В свою очередь липосомы с ЛК значительно тушили флуоресценцию ДФ. Водорастворимые формы ЛК, демонстрировали значительное увеличение интенсивности флуоресценции ДФ, тем самым проявляя прооксидантные свойства в выбранной нами модели. По-видимому, данные результаты можно объяснить очень слабым проникновением водорастворимых препаратов в клетки.

Таким образом, используя НСТ-тест и метод проточной цитометрии с флуоресцентным соединением ДФ было определено, что «пустые» ФХ-липосомы и в большей степени ФХ-липосомы, содержащие ЛК, оказывают влияние на метаболические процессы при активации НФ с помощью ФМА за счёт уменьшения образования АФК.

#### Литература:

1. Steven W. E. *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*.// Cambridge University Press, 1994 2. Щелконогов В.А., Сорокоумова Г.М., Баранова О.А. и др. Взаимодействие липосомальной формы липоевой кислоты с компонентами крови человека. IX Международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития", Москва, 2017, 20-22 февраля., Т.2, с.579-580

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ (регистрационный номер НШ-7946.2016.11) и в рамках Государственного задания (№ госрегистрации 1 04 011 056).

УДК: 615.032.13

## THE INFLUENCE OF THE LIPOSOMAL FORM OF A-LIPOIC ACID ON OXIDATIVE BURST OF NEUTROPHILS

V.Shchelkonogov <sup>1</sup>, G.Javadova <sup>1</sup>, N.Shastina <sup>1</sup>, G.Sorokoumova <sup>1</sup>, K.Sarvas <sup>2</sup>, A.Chekanov <sup>2</sup>, O.Baranova <sup>2</sup>, K.Kazarinov <sup>3</sup>, E.Solovieva <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Moscow technological University (cluster MITHT), Russia, 119571, Moscow, Vernadsky prospectus, 86

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Russia, 117997, Moscow, Ostrovitianov str., 1

<sup>3</sup> Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics, RAS (Fryasino branch), Russia, 141190, Moscow region, Fryazino, Vvedensky sq., 1

It has been studied the interaction of the liposomal form of  $\alpha$ -lipoic acid (LA) with reactive oxygen species (ROS) upon activation of neutrophils (NF) by phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Based on the NBT-test, it has been estimated the effect of liposomes containing LA on the accumulation of superoxide anion radical during of oxidative burst of NF. Using flow cytometry assay and the fluorescent compound 2,7-dichlorofluorescein (DCF), it has been shown the interaction of the liposomes with LA with oxygen-containing radicals.

**Key words:** liposomes,  $\alpha$ -lipoic acid, neutrophils, reactive oxygen species.

The change of activity of neutrophils (NF) is one of the factors that determine the development and progression of pathological processes in the human body. Excessive accumulation of ROS leads to a sharp increase in metabolic activity of NF, and, in future, to their death [1]. Therefore, it is necessary to reduce the activity of these processes using antioxidants (AO), as well as precisely understand the mechanisms of action of AO.

The aim of this work is to investigate the effect of the liposomal form of LA on the oxidative burst of neutrophils.

Previously, liposomes with LA were obtained, characterized by the encapsulation efficiency of a substance equal to 85 % and the stability during long - term storage. Also, using the method of luminal-dependent chemiluminescence (LDC), it has been shown that the "empty" phosphatidylcholine liposomes (PC-liposomes), and to a greater extent the liposomes with LA, suppress the formation of ROS during the activation of neutrophils by FMA [2].

In the present research work the studies were carried out to establish the mechanism of action of liposomal forms of LA and to evaluate its effect on metabolic processes in NF. At the first stage of the research work the cell culture of the NF was qualitatively evaluated. When NF was stained by trypan blue, the survival rate of NF was equal to 95%. By using flow cytometry assay and markers for CD8, CD16, and CD24 it has been shown that 0.8% of lymphocytes and 4.2% of monocytes were contained in the obtained NF samples.

To establish the mechanism of action of the liposomal form of LA on neutrophils, i. e., the determination with which ROS it predominantly interacts, the test with p-nitrophenyltetrazolium chloride – NBT-test was performed. It is known that soluble NBT is captured by neutrophils and reduced by superoxide anion radicals (SOAR) produced by the cells, up to diformazane, which settle out in cells as blue crystals. As a result of researches it has been revealed that NF had the insignificant spontaneous activity caused by a low content of SAR in cells. Addition of PMA to NF led to the considerable increase in the formation of a quantity of diformazane, i. e. SOAR, due to activation of cells. In turn, the introduction of "empty" PC-liposomes and liposomes with LA (CLA = 1 mM) in this system significantly reduced the formation of SOAR. When a water-soluble form or ethylenediamine salt of LA was added (CLA = 1 mM), it has been occurred a notable increase in the amount of SOAR. Most likely that the obtained results indicate that the addition of liposomes with LA allows the LA to penetrate into the cell in large quantities, as a result of which the SOAR is neutralized. Furthermore, unsaturated lipids, which are part of liposomes, are able to interact with SOAR, which also leads to decrease of SOAR. The water-soluble form and ethylene diamine salt of LA, are likely, to penetrate into the cell in very low amounts and have a pro-oxidant effect.

At the next stage of the research work, the effect of the liposomal form of LA on the accumulation of oxygen-containing (O-centered) radicals (O-r) in NF, previously activated by PMA, has been estimated, using the fluorescent probe 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). It is known that DCFH-DA easily penetrates through the cell membrane and under the action of intracellular esterases, it is deacetylated to 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH), which upon oxidation with O-r ( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ , etc.) is oxidized to form a fluorescent compound 2,7-dichlorofluorescein (DCF). The fluorescence intensity of DCF was registered on a flow cytometer. As a result of research studies it has been shown that the NF have their own luminescence due to exposure to cells by coherent laser radiation ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ), which is conditioned by the presence of oxidized flavoproteins. Its luminescence was significantly increased in the presence of PMA. The addition of "empty" PC-liposomes contributed to the increase in the intensity of fluorescence upon activation of NF by FMA, and liposomes with LA essentially inhibited the fluorescence intensity of cells. In turn, water-soluble forms of LA stimulated the activity of NF, exhibiting pro-oxidant properties.

The addition of DCFH-DA and PMA to neutrophils led to the significant increase in fluorescence intensity, compared to native NF with its fluorescent probe, due to the formation of a large amount of oxygen-containing radicals. In addition, the PC-liposomes increased the fluorescence intensity of DCF during the activation of NF by the action of FMA, due to the oxidation of the lipids, included in liposomes. In turn, the liposomes with LA markedly quenched the fluorescence of DCF. The water-soluble forms of LA demonstrated a significant increase in the fluorescence intensity of DCF, thereby exhibiting pro-oxidant properties in the model chosen by us. Apparently, these results can be explained by the very weak penetration of water-soluble drugs into cells.

Thus, using NBT-test and flow cytometry technique with the fluorescent probe DCF, it has been determined that "empty" PC-liposomes and to a greater extent PC-liposomes, containing LK, influence on metabolic processes upon of the activation of NF by FMA, due to the decrease of formation of ROS.

#### References:

1. Steven W. E. *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*.// Cambridge University Press, 1994. 2. Shchelkonogov V.A., Sorokoumova G.M., Baranova O.A. et al. *the interaction of the liposomal forms of lipoic acid with the components of human blood*.// X international Congress "Biotechnology: state of the art and perspectives", Moscow, 2017, 20-22 Feb., 2, V. 2, pp. 579-580.

**Grant:** The research work was carried out within the framework of the grant of the President of the Russian

Federation for state support of leading scientific schools (registration number NSH-7946.2016.11) and within the framework of the State task (State Registration № 1 04 011 056).

УДК 576.524

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ТИТАНА НА АДГЕЗИЮ ФИБРОБЛАСТОВ

Хрунык Ю.Я.<sup>2</sup>, Фадеев Ф.А.<sup>1</sup>, Луговец Д.В.<sup>1</sup>, Маракулина А.В.<sup>2</sup>, Губаева О.В.<sup>1</sup>, Беликов С.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия  
620026, Екатеринбург, ул. Карла Маркса, д. 22А

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Уральский Федеральный Университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия  
e-mail: fdf79@mail.ru

Проведено сравнение уровня адгезии дермальных фибробластов человека на необработанной поверхности титана и на анодированной поверхности, покрытой нанотрубками.

**Ключевые слова:** титановые импланты, нанотрубки, дермальные фибробласты, адгезия клеток.

Одной из главных проблем использования имплантатов являются осложнения, связанные с их приживлением в тканях организма, что связывают с низким уровнем адгезии клеток и, как следствие, формированием полости вокруг имплантата. Наиболее часто используемым для изготовления имплантатов материалом является титан. Для повышения адгезивности имплантатов используются различные способы обработки поверхности титана, включая анодирование с образованием нанотрубок. Предполагается, что нанотрубки должны увеличивать площадь поверхности и создавать полости для внедрения отростков клеток, повышая адгезивную активность остеобластов.

Нами была разработана модификация технологии анодирования титановой поверхности, позволяющая контролировать размер образующихся нанотрубок. Нами была проведена сравнительная оценка уровня адгезии первичной культуры дермальных фибробластов на поверхности анодированного титана с нанотрубками диаметром 40 нм, считающимися подходящими для адгезии клеток, и необработанного титана. В качестве контроля использовали культуральный полистирол. Оценивали количество адгезировавшихся клеток и их площади.

Фибробласты высевали на поверхность титановых дисков с нанотрубчатой или необработанной поверхностью, а также на поверхность культурального пластика. Диски инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, через определенные промежутки времени (4, 8, 12 и 24 часа) клетки фиксировали и окрашивали. Для подсчета количества и оценки площади клеток использовали программу ImageJ.

Количество фибробластов, адгезировавшихся на пластике, во всех временных точках было выше, чем на титановых дисках обоих типов. При этом средняя площадь адгезировавшихся на культуральном пластике клеток была достоверно ниже, чем на титане.

В то же время, при сравнении плотности и площади адгезировавшихся клеток на нанотрубчатых и необработанных титановых дисках статистически достоверные различия этих показателей были выявлены лишь в одной временной точке (24 часа). Количество фибробластов в данный момент времени на анодированных дисках было достоверно выше (в 1,25 раза), чем на необработанных, тогда как средняя площадь клеток, напротив, была в 1,4 раза выше на необработанном титане. Анализ размерных характеристик адгезировавшихся клеток показал, что выявленные различия обусловлены присутствием на титане с обработанной поверхностью большего количества малоразмерных клеток по сравнению с необработанным, тогда как количество адгезировавшихся крупноразмерных фибробластов на обоих типах дисков достоверно не различалось.

Таким образом, полученный результат не позволил выявить существенных различий по уровню адгезии фибробластов на обработанном и необработанном титане. Роль фибробластов в приживлении имплантата является двойственной: они являются продуцентами компонентов внеклеточного матрикса, участвуя в заживлении ран, но, в то же время, с ними связывают образование фиброзной капсулы вокруг имплантата с последующим его отторжением. Соответственно, можно предполагать, что нанотрубчатая поверхность, способствуя лучшей адгезии остеобластов, в то же время не будет приводить к повышению уровня адгезии фибробластов и связанному с этим отторжению имплантата. Работа частично финансировалась Российским научным фондом (грант №18-13-00220).



UDC 576.524

## THE EFFECT OF TITANIUM SURFACE TREATMENT ON FIBROBLASTS ADHESION

**Khrunyk Y.Y.<sup>2</sup>, Fadeyev F.A.<sup>1</sup>, Lugovets D.V.<sup>1</sup>, Marakulina A.V.<sup>2</sup>, Gubaeva O.V.<sup>1</sup>, Belikov S.V.<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russia  
620026, Ekaterinburg, 22A Karl Marx str.<sup>2</sup> Ural Federal University, Ekaterinburg, Russia  
e-mail: fdf79@mail.ru

Adhesion activity of human dermal fibroblasts was tested on anodized titanium samples with nanotube-layered surfaces and titanium samples with untreated surfaces.

**Key words:** titanium implants, nanotubes, dermal fibroblasts, cell adhesion.

One of the most significant challenges of implantation is the complications, which may accompany implant osteointegration. The formation of a cavity between the implant and the tissue is usually considered to be the result of low cell adhesion on implant surface. Nowadays, titanium is the most common implant material. Different ways of surface treatment are used to increase the biocompatibility of implants, including nanotubes fabrication by titanium anodizing. Nanotubes are assumed to promote cells adhesion as they provide increased implant surface area and holes for cytoplasmic extensions.

The technology of titanium surface anodizing that allows controlling the size of growing nanotubes was modified. We compared the cell adhesion activity of human dermal fibroblasts on the surfaces of untreated titanium and anodized titanium with nanotubes of 40 nm diameter. The nanotubes of this size are considered to be suitable for cell adhesion. The cell culture treated polystyrene was used as control. The quantity of adhered cells and their area were evaluated.

Fibroblasts were seeded on the surface of untreated titanium discs, on discs with nanotubes and on the control polystyrene. Discs were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, after certain time periods (4, 8, 12, and 24 hours) cells were fixed and stained. To estimate cell quantity and cell area, the ImageJ software was used.

At all the time points the quantity of fibroblasts on polystyrene was higher than on both types of titanium discs, though the average area of cells, adhered on polystyrene, was lower, than on titanium.

Also, the differences in quantity and area of adhered cells between titanium discs with nanotubes and untreated discs were statistically significant at the single time point: 24 hours. At this time point the quantity of fibroblasts on nanotube discs was 1.25 times higher than on untreated ones, while the average cell area was 1.4 times higher on the surface of untreated titanium. The analysis of the size of adhered cells showed that these differences were due to the presence of larger quantities of small-sized cells on the anodized surface in comparison with untreated titanium, while there were no significant differences in the quantities of adhered large-sized fibroblasts on treated and untreated titanium samples.

These results did not demonstrate the dramatic differences in fibroblast adhesion activity between anodized and untreated titanium. The role of fibroblasts in implant osteointegration is controversial: they play an essential role in extracellular matrix components production and in wound healing, though they also cause the fibrous encapsulation of implant and its further rejection. It can be suggested that while nanotube surface is suitable for osteoblasts adhesion, it will not cause elevated level of fibroblasts adhesion, and hence, the implant rejection. This work was partly funded by the Russian Science Foundation (grant no. 18-13-00220).

## ВЛИЯНИЕ ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ТИПА ЯДРО@ОБОЛОЧКА Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au

Тагирова М.А.<sup>1</sup>, Веселов М.М.<sup>1</sup>, Ефремова М.В.<sup>1,2</sup>, Бараковская И.<sup>2</sup>, Секундо Ф.<sup>3</sup>, Мажуга А.Г.<sup>2,4</sup>, Головин Ю.И.<sup>1,5</sup>, Клячко Н.Л.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Лаборатория химического дизайна бионаноматериалов, химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1-11Б, Россия

<sup>2</sup> Национальный технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

<sup>3</sup> Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Milano, Italy

<sup>4</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>5</sup> Наноцентр, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия  
e-mail: mashxurat@mail.ru

Изучена ферментативная активность фенилацетонмонооксигеназы, иммобилизованной на поверхности наночастиц типа ядро@оболочка Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au под воздействием переменного магнитного поля с частотами 50, 110 и 250 Гц. Показано, что под действием магнитного поля наблюдалось увеличение каталитической активности иммобилизованного фермента.

**Ключевые слова:** магнитные наночастицы, фенилацетонмонооксигеназа, низкочастотное переменное магнитное поле, иммобилизованные ферменты

В последнее время активно развиваются новые возможности использования наноматериалов в биотехнологии, и, следовательно, многие исследователи сосредоточены на изучении новых подходов к иммобилизации белковых молекул на наноразмерных носителях. Применение нанобъектов, таких как наночастицы металлов и квантовые точки, гели и полимерные матрицы, в качестве носителей для иммобилизации ферментов позволяет использовать их уникальные свойства (магнитные, размерные, оптические) для создания новых типов биокатализаторов. В связи с этим нами была разработана схема иммобилизации фенилацетонмонооксигеназы (РАМО) на магнитных наночастицах типа ядро@оболочка Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au. Данные частицы сочетают в себе уникальные магнитные свойства магнетитового ядра и высокую коллоидную стабильность, биосовместимость и простоту функционализации золотой оболочки [1, 2].

В качестве фермента для иммобилизации нами был выбран фермент РАМО из семейства монооксигеназ Байера-Виллигера, катализирующий окисление нециклических и циклических кетонов до сложных эфиров и лактонов, соответственно, и являющийся наиболее стабильным представителем этого семейства [3]. Данный фермент представляет большой интерес для его использования как катализатора для получения важных для промышленности веществ. Фермент был иммобилизован благодаря образованию связи S-Au между остатками цистеина 65 и 73 и золотой поверхностью наночастиц. В результате иммобилизации нами получен активный биоконъюгат фермента, обладающий магнитными свойствами. Полученный препарат был охарактеризован с помощью метода анализа траектории наночастиц, динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии. За вторичной структурой белка следили с помощью ИК-Фурье спектроскопии.

Для изучения влияния низкочастотного ПМП на ферментативную активность РАМО, иммобилизованного на магнитных наночастицах Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au были проведены кинетические измерения. Наблюдение за кинетикой реакции осуществляли по убыли концентрации НАДФ-Н, измеряя его поглощение при длине волны 340 нм. Под действием магнитного поля нами наблюдалось увеличение каталитической активности иммобилизованного фермента. Эффект увеличения активности под действием ПМП не зависел от частоты в диапазоне 50-250 Гц и составил 2-2,5 раза. Нами выдвинута гипотеза о наномеханическом воздействии наночастиц на структуру иммобилизованного РАМО под влиянием ПМП.

Работы выполнены при финансовой поддержке грантов РНФ 14-13-00731 и РФФИ 17-54-33027 с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

### Литература:

1. A. Majouga, et al. (2015). Enzyme-functionalized gold-coated magnetite nanoparticles as novel hybrid nanomaterials: synthesis purification and control of enzyme function by low-frequency magnetic field. *Colloids*

*Surfaces B: Biointerfaces*. V. 125. P. 104-109.

2. П.Г. Рудаковская и др. (2015). Синтез наночастиц магнетита-золота с структурой сердцевина-оболочка. *Бюлл. Московского университета*. Т. 56. С. 181-189.

3. Malito E. et al. (2004). Crystal structure of a Baeyer–Villiger monoxygenase. *PNAS*. V. 101. P. 13157-13162.

## EFFECT OF ALTERNATING MAGNETIC FIELD ON THE STRUCTURE AND CATALYTIC ACTIVITY OF IMMOBILIZED ON THE SURFACE OF CORE@SHELL Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NANOPARTICLES PHENYLACETONMONOXYGENASE

Tagirova M.A.<sup>1</sup>, Veselov M.M.<sup>1</sup>, Efremova M.V.<sup>1,2</sup>, Barakovskaya I.<sup>2</sup>, Secundo F.<sup>3</sup>, Majouga A.G.<sup>2,4</sup>, Golovin I.I.<sup>1,5</sup>, Klyachko N.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory for Chemical Design of Bionanomaterials, School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> National University of Science and Technology MISiS, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, CNR, Milano, Italy

<sup>4</sup> D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Nanocenter, G. R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

e-mail: mashxurat@mail.ru

The structure and catalytic activity of phenylacetone monoxygenase immobilized on the surface of nanoparticles of the core@shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au under the action of an alternating magnetic field at frequencies of 50, 110 and 250 Hz was studied. The enzyme catalytic activity increase was observed under the action of a magnetic field.

Keywords: magnetic nanoparticles, phenylacetone monoxygenase, low-frequency alternating magnetic field (LF AMF), immobilized enzymes

Recently, new opportunities for using nanomaterials in biotechnology are actively developing, and, therefore, many researchers focus on studying new approaches to the immobilization of protein molecules on nanosized carriers. The use of nanoobjects, such as metal nanoparticles and quantum dots, gels and polymer matrices, as carriers for enzyme immobilization, makes it possible to use their unique properties (magnetic, dimensional, optical) to create new types of biocatalysts [1]. In connection with this, we developed a scheme for the immobilization of phenylacetone monoxygenase (PAMO) on core@shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au magnetic nanoparticles. These particles combined the unique magnetic properties of the magnetite core and high colloidal stability, biocompatibility and simplicity of the gold shell's functionalization [2].

As an enzyme for immobilization, we selected a PAMO enzyme from the Bayer-Villiger family of monoxygenases that catalyzes the oxidation of non-cyclic and cyclic ketones to esters and lactones, respectively, and is the most stable representative of this family [3]. This enzyme is of great interest for its use as a catalyst for obtaining important substances for industry. The enzyme was immobilized due to the formation of the S-Au bond between the cysteine residues 65 and 73, and the gold surface of the nanoparticles. The obtained preparation was characterized by the method of nanoparticle trajectory analysis, dynamic light scattering and transmission electron microscopy. The secondary structure of the protein was monitored by IR Fourier spectroscopy.

To study the effect of low-frequency AMF on the catalytic activity of PAMO immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au magnetic nanoparticles, kinetic measurements were carried out. Observation of the kinetics of the reaction was carried out by decreasing the concentration of NADP-H, measuring its absorbance at 340 nm. Magnetic field caused an increase in the catalytic activity of the immobilized enzyme. The effect of the activity increase under the action of AMF did not show any frequency dependence in 50-250 Hz range and amounted to 2-2.5 times. We put forward a hypothesis about the nanomechanical effect of nanoparticles on the structure of immobilized PAMO under the influence of AMF.

The work was supported in part by RSF-14-13-00731 and RFBR 17-54-33027 grants and M.V. Lomonosov Moscow State University Program of Development.

### References:

1. A. Majouga, et al. (2015). Enzyme-functionalized gold-coated magnetite nanoparticles as novel hybrid nanomaterials: synthesis purification and control of enzyme function by low-frequency magnetic field. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. V. 125. P. 104-109.

2. Rudakovskaya P.G. et al. (2015). Synthesis of magnetite-gold nanoparticles having a core-shell structure. *Moscow University Bull*. V. 56. P. 181-189.

3. Malito E. et al. (2004). Crystal structure of a Baeyer–Villiger monoxygenase. *PNAS* V. 101. P. 13157-13162.

УДК., 615.015.1

## ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА, ИНКАПСУЛИРОВАННОГО В ПОЛИМЕРЫ.

Е.М. Лялина, В.С. Зуева, С.А. Минаева.

Институт фотонных технологий, ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН, Москва, Россия  
108840 г. Москва, г. Троицк, ул. Пионерская, д. 2.  
e-mail: katikin@mail.ru

Исследовано влияние параметров процесса поверхностно-селективного лазерного спекания биорезорбируемых полимеров с использованием воды в качестве сенсibilизатора нагрева на скорость высвобождения и активность трипсина, включенного в спекаемые полимеры.

**Ключевые слова:** биорезорбируемые полимеры, трипсин, биоактивность, поверхностно-селективное лазерное спекание.

При селективном лазерном спекании порошков полимеров, с включенными в них биологически активными веществами, существует вероятность их термического разложения и потери биологической активности. Разрабатываемые нами методы поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС) [1] позволяют уменьшить температуру нагрева спекаемых частиц и, соответственно, вероятность изменения их биохимических свойств. В данной работе нами исследовалось влияние параметров модифицированного метода ПСЛС с использованием воды в качестве сенсibilизатора лазерно-индуцированного нагрева поверхности полимера на кинетику выхода, а также уровень биоактивности трипсина, инкапсулированного в полимерные частицы. Для включения трипсина в полимер использовалось явление пластификации аморфных алифатических полиэфигов в сверхкритическом диоксиде углерода (ск-СО<sub>2</sub>) [2]. Трипсин (Самсон-Мед, Россия) в количестве 10 масс.% смешивался с порошком полилактогликолида PDLG 7507 (Purac, Biochem bv, Нидерланды), который затем пластифицировался под действием ск-СО<sub>2</sub> при 10 МПа и 40°С в течение одного часа. После сброса давления до атмосферного значения, формировался пористый композит в виде монолита, который затем размалывался до получения порошка с размером частиц порядка 100 мкм. Приготовленные порошки спекались в трехмерные матричные структуры с использованием излучения волоконного тулиевого лазера с длиной волны 1,94 мкм (ИРЭ-Полус). Спекание осуществлялось при различных скоростях сканирования лазерного пучка, а также: без смачивания порошка и с его увлажнением в течение 30 сек. Исследованы кинетика высвобождения трипсина в Трис-Е буфер (Gerbu Trading GmbH, ФРГ) и его активность как для образцов, сформированных в ск-СО<sub>2</sub>, так и спеченных методом ПСЛС.

Кинетика высвобождения трипсина из композитных матриц, изучалась с использованием спектрофотометра "Beckman U-70" (Германия) на длине волны 280 нм. При расчете количества, высвободившегося трипсина, за 100% принималось содержание фермента в матрицах в количестве 2 мг. Исследования показали, что формирование с помощью ПСЛС композитных матриц с включенным в них трипсином, позволяет замедлить скорость его высвобождения почти в три раза. При этом из спеченных образцов может выходить от 25 до 80 % трипсина. Активность трипсина до и после лазерного воздействия на полимерные микрочастицы определялась с помощью стандартной методики гидролиза хромогенного субстрата р-нитроанилида бензоиларгинина (Bz-Arg-pNA) - L-BAPNA (Merck, ФРГ) в Трис-Е буферном растворе по измерению оптической плотности супернатанта на длине волны 410 нм. Активность фермента, включенного в полимер в ск-СО<sub>2</sub>, принималась за 100%. Исследования показали, что активность фермента уменьшается с ростом поглощенной энергии лазерного излучения, но сохраняет значительную часть своей активности, до 43% при скоростях спекания 20 мм/сек и энергии лазерного излучения 3 Вт.

Проведенные исследования показали, что лазерные и сверхкритические флюидные технологии могут быть эффективно использованы в фармации и тканевой инженерии для формирования матричных структур, обеспечивающих управляемый и пролонгированный выход биологически активных веществ.

Работа выполнена при поддержке ФАНО (Соглашение №007-ГЗ/ЧЗ363/26) в части исследования активности трипсина и РФФИ (Проект № 16-02-00473) в части формирования матричных структур.

### Литература:

1. Попов В.К., Antonov E.N., et al. Surface selective laser processing: a new methodology to work with thermoliable polymer particles//Regen. Med. 2009. №4. P. 253-254.
2. Попов В.К., Краснов А.П., Воложин А.И. Ходул С.М., Новые биоактивные композиты для регенерации костных тканей//Персп. Материалы. 2004. №4. С.49-57.

UDC, 615.015.1

## INFLUENCE OF SURFACE-SELECTIVE LASER SINTERING ON THE ACTIVITY OF TRYPsin INCAPULATED IN POLYMERS.

**E.M. Lyalina, V.S. Zueva, S.A.Minaeva**

*Institute of Photonic Technologies Federal Research Centre "Crystallography and Photonics" Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
 108840 Moscow, Troitsk, Pionerskaya str. 2.  
 e-mail: katikin@mail.ru*

The effect of parameters of surface-selective laser sintering bioresorbable polymers using water as a sensitizer of heating on release rate and activity of trypsin incorporated in sintered polymers was studied.

**Key words:** bioresorbable polymers, trypsin, bioactivity, surface-selective laser sintering.

In selective laser sintering of polymer powders with included biologically active substances there is a possibility of their thermal decomposition and loss of biological activity. We develop methods of surface-selective laser sintering (SSLS) [1] that allow reducing the heating temperature of sintered particles and accordingly the probability to change their biochemical properties. In this paper we investigated the effect of parameters of the modified SSLS method using water as a sensitizer of laser-induced heating of the polymer surface on the kinetics of the release, as well as the bioactivity of trypsin encapsulated in polymer particles. To incorporate trypsin into the polymer, the plasticization of amorphous aliphatic polyesters in supercritical carbon dioxide (sc-CO<sub>2</sub>) was used [2]. The trypsin powder (Samson-Med, Russia) in an amount of 10 wt% was mixed with the PDLG 7507 polylactoglycolide powder (Purac, Biochem bv, The Netherlands), which was then plasticized by sc-CO<sub>2</sub> at 10 MPa and 40 ° C for one hour. After the pressure was reduced to atmospheric pressure, a porous composite was formed in the form of a monolith, which was then ground to a powder with a particle size of about 100 μm. The prepared powders were sintered into three-dimensional matrix structures using radiation from a 1.94-micron fiber thulium laser (IRE-Polus). Sintering was carried out at different scanning speeds of the laser beam, and also: without wetting the powder and with its wetting for 30 seconds. The kinetics of trypsin release into Tris-E buffer (Gerbu Trading GmbH, Germany) and its activity both for samples formed in sc-CO<sub>2</sub> and SSLS were investigated.

The kinetics of trypsin release from composite matrices was studied spectrophotometrically at 280 nm wavelength using "Beckman U-70" (Germany) spectrophotometer. The content of the enzyme in the matrix was taken as 100% in the amount of 2 mg for calculating the amount of released trypsin. Studies have shown that the formation of trypsin composite matrices with the SSLS makes it possible to slow the rate of its release by almost three times. In this case, from 25 to 80% of trypsin can be released from the sintered samples.

The activity of trypsin before and after laser exposure to polymeric microparticles was determined using a standard technique for hydrolysis of the chromogenic substrate of p-nitroanilide benzoylarginine (Bz-Arg-pNA) -L-BAPNA (Merck, FRG) in Tris-E buffer solution from the measurement of the optical density of the supernatant on the wavelength of 410 nm. The activity of the enzyme included in the polymer by sc-CO<sub>2</sub> was taken as 100%. Studies have shown that the activity of the enzyme decreases with increasing absorbed energy of laser radiation, but significant part of its activity, up to 43% at sintering rates of 20 mm / sec and laser radiation energy of 3 W was remained.

Studies have shown that laser and supercritical fluid technologies can be effectively used in pharmacy and in tissue engineering to form matrix structures that provide controlled and prolonged release of biologically active substances.

The work was supported by Federal Agency of Scientific Organizations (Agreement No 007-ГЗ/43363/26) in the part of trypsin activity studies and by Russian Foundation for Basic Research (Project No. 16-02-00473) in the part of matrix structures formation.

### References:

1. Popov V. K., Antonov E.N., et al., *Surface selective laser processing: a new methodology to work with thermo labile polymer particles // Regenerative Med.* 2009. 4. P. 253-254.
  2. Popov V.K., Krasnov A.P., Volozhin A.I., Hoodle S.M., *New bioactive composites for the regeneration of bone tissues // Perspektivnyye. Materialy (In Russ.).* 2004. 4. P. 49-57.
- Работа выполнена при поддержке ФАНО (Соглашение №007-ГЗ/43363/26) в части исследования активности трипсина и РФФИ (Проект № 16-02-00473) в части формирования матричных структур.*

УДК 615.451.22

## ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ГИДРОФОБНОГО ДОМЕНА ЛИПОАМИНОКИСЛОТ НА ТРАНСФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИПОСОМ НА ИХ ОСНОВЕ

Загитова Р.И. <sup>1</sup>, Лосева А.А. <sup>1</sup>, Носова А.С. <sup>1,2</sup>, Колоскова О.О. <sup>2</sup>, Буданова У.А. <sup>1</sup>, Себякин Ю.Л. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова), Москва, Россия

<sup>2</sup> Государственный научный центр «Институт иммунологии», Москва, Россия  
119571, г. Москва, проспект Вернадского, 86  
e-mail: agidel-r@mail.ru

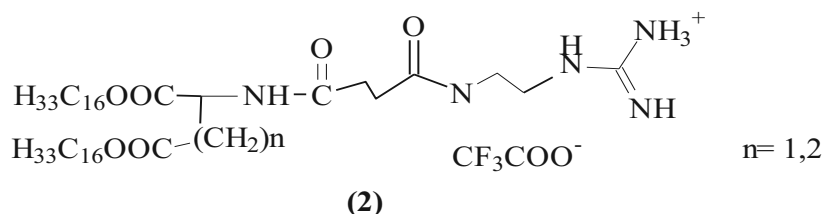
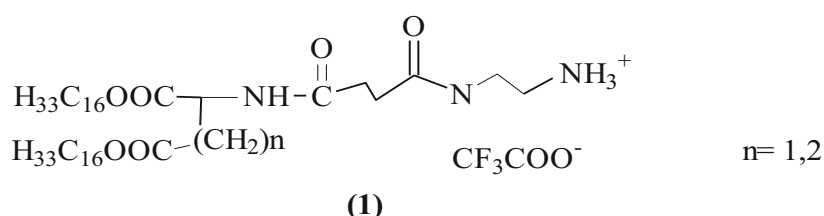
Получены липоаминокислоты, содержащие в гидрофобном блоке остатки L-аспарагиновой и L-глутаминовой кислот. Показано, что структура гидрофобного домена значительно влияет на трансфекцию – при переходе от дизфиров L-глутаминовой кислоты к соединениям на основе L-аспарагиновой кислоты наблюдалось стократное увеличение эффективности трансфекции.

**Ключевые слова:** катионные амфифилы; липоаминокислоты; катионные липосомы; трансфекция; липофекция.

Использование комплексов липидных наночастиц с нуклеиновыми кислотами (липоплексы) является одной из основных стратегий доставки генетического материала. Модификация структуры компонентов липосом может влиять на биораспределение лекарственного средства, способ высвобождения содержимого и эффективность системы в целом [1].

В данной работе синтезированы четыре типа аминокислотных амфифилов с различными терминальными полярными концевыми группами и структурой гидрофобного блока (1,2). В качестве основы для гидрофобного домена использовались L-аспарагиновая и L-глутаминовая кислоты. Полярный домен получали на основе производных этилендиамина и/или с последующей модификацией производными тиомочевины. Затем проводили конъюгацию двух частей. Из синтезированных соединений формировали катионные липосомы.

Преимущество разработанных схем катионных амфифилов на основе дизфиров аминокислот и диаминов заключается в универсальности подхода, который можно применять к различным структурам, что позволяет наработать множество вариантов продуктов, не прибегая к поиску новых путей синтеза.



Известно, что на трансфекционную активность могут влиять различные вариации гидрофобных доменов [2]. В ходе изучения эффективности трансфекции на клеточных линиях НЕК 293Т с помощью люциферазного теста установлено, что соединения с L-аспарагиновой кислотой в качестве остова гидрофобного домена демонстрируют гораздо большую эффективность трансфекции, чем такие же соединения с L-глутаминовой кислотой. Вероятно, это объясняется особой конформацией боковых цепей аминокислот, что влияет на расположение углеводородных цепей в гидрофобном домене. При этом структура полярной части оказывает меньшее влияние на способность липосом на основе липоаминокислот доставлять нуклеиновые кислоты внутрь клеток (Таблица 1).

Таблица 1.

Структура липосом	Активность люциферазы, RLU
NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHSucAsp (C16) <sub>2</sub>	361 818 ± 525
NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHSucGlu(C16) <sub>2</sub>	179 ± 2
GndNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHSucAsp(C16) <sub>2</sub>	34 784 ± 193
GndNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHSucGlu(C16) <sub>2</sub>	300 ± 34

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-01141.

Литература:

- Schroeder A., Levins C.G., Cortez C., Langer R., Anderson D.G. (2010) *Journal of Internal medicine*, 267, 9–21. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02189.x
- Caracciolo G., Amenitsch H. (2012) *European Biophysics Journal*, 41(10), 815–829. DOI: 10.1007/s00249-012-0830-8.

UDC 615.451.22

## INFLUENCE STRUCTURE OF HYDROPHILIC DOMAINS OF LIPOAMINOACIDS ON TRANSFECTION ACTIVITY OF CATIONIC LIPOSOME

Zagitova R.I.<sup>1</sup>, Loseva A.A.<sup>1</sup>, Nosova A.S.<sup>1,2</sup>, Koloskova O.O.<sup>2</sup>, Budanova U.A.<sup>1</sup>, Sebyakin Yu.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Moscow Technological University (Institute of Fine Chemical Technologies named by M. V. Lomonosov), Moscow, Russia

119571, Moscow, Vernadsky Prospekt, 86

<sup>2</sup> State Research Center "Institute of Immunology", Moscow, Russia

e-mail: agidel-r@mail.ru

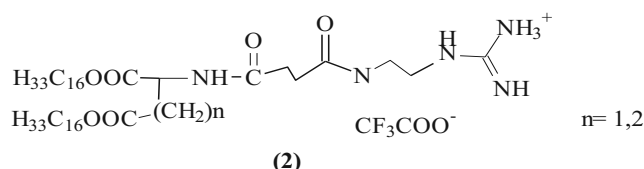
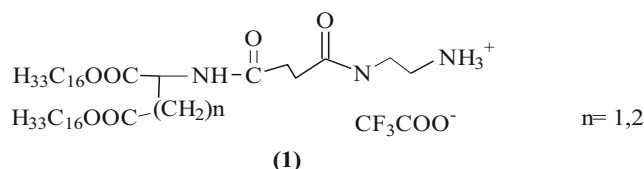
Lipoaminoacids with diesters of aminoacids (Asp or Glu) in hydrophobic block was prepared. It was shown that the structure of the hydrophobic domain significantly influences on transfection – change the L-glutamic acid diester to the L-aspartic acid-based compounds resulted in a hundredfold increase in transfection efficiency.

**Key words:** cationic amphiphiles; lipoamino acids; cationic liposomes; transfection; lipofection.

The use of complexes of lipid nanoparticles with nucleic acids (lipoplexes) is one of the main strategies for delivery of genetic material. Modification of the structure of the components of liposomes can affect the biodistribution of the drug, the way the contents are released and the effectiveness of the system as a whole [1].

In this paper, four types of amine-containing amphiphiles with different terminal polar end groups and the structure of the hydrophobic block were synthesized. The base for the hydrophobic domain was L-aspartic and L-glutamic acid (1, 2). The polar domain was obtained on the basis of ethylenediamine derivatives and / or with subsequent modification by thiourea derivatives. Then conjugation of two parts was carried out. From the synthesized compounds, cationic liposomes were formed.

The advantage of the developed schemes of cationic amphiphiles based on diesters of amino acids and diamines is the universality of the approach, which can be applied to various structures and allows us to develop a variety of product options without resorting to searching for new synthesis routes.



It is known that transfection activity can be influenced by different variations of hydrophobic domains [2]. In the study of efficiency of transfection on HEK 293K cell lines, it has been found that the compounds with L-aspartic acid as the backbone of the hydrophobic domain show a much greater transfection efficiency than the same compounds with L-glutamic acid. This is probably explained by the special conformation of the side chains of amino acids, which affects the arrangement of hydrocarbon chains in the hydrophobic domain. At the same time, the structure of the polar part has a lesser effect on the ability of lipoamines based on lipoamino acids to deliver nucleic acids into cells (Table 1).

Table 1

Structure of liposomes	Activity of luciferase, RLU
NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHSucAsp (C16) <sub>2</sub>	361 818 ± 525
NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHSucGlu(C16) <sub>2</sub>	179 ± 2
GndNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHSucAsp(C16) <sub>2</sub>	34 784 ± 193
GndNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NHSucGlu(C16) <sub>2</sub>	300 ± 34

This work was supported by the grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 17-04-01141.

References:

1. Schroeder A., Levins C.G., Cortez C., Langer R., Anderson D.G. (2010) *Journal of Internal medicine*, 267, 9–21. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02189.x
2. Caracciolo G., Amenitsch H. (2012) *European Biophysics Journal*, 41(10), 815–829. DOI: 10.1007/s00249-012-0830-8.

УДК 615.33+615.8

## ВОЗМОЖНОСТЬ НАПРАВЛЕНИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ

А. А. Олешкевич, Ф. И. Василевич

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина», Москва, Россия  
109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина 23, кафедра Информационных технологий, математик и физики  
e-mail: kompsotita@gmail.com

На биосенсорах *Aliivibrio fischeri* изучено сочетанное и раздельное влияние ультразвука и противоопухолевых цитостатических препаратов. Определён оптимальный режим предпосевной обработки фотобактерий: интенсивность — 0,4 Вт/см<sup>2</sup>, экспозиция 5 мин, концентрация циклофосфана — 0,2 мг/мл, доксорубицина — 0,8 мг/мл исходной питательной среды.

**Ключевые слова:** цитостатики, доксорубицин, циклофосфан, фотобактерии, рост, ультразвук, интенсивность люминесценции.

В Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К. И. Скрябина исследована возможность адресной доставки лекарственных препаратов в живые, пролиферирующие, предварительно сенсibilизированные клетки-мишени.

На биосенсорах, бактериальной культуре *Aliivibrio fischeri* б, изучено сочетанное и раздельное влияние непрерывного ультразвука (УЗ) низкой терапевтической интенсивности 0,4 Вт/см<sup>2</sup> и противоопухолевых препаратов: доксорубицина и циклофосфана. Доксорубицин — антибиотик антрациклинового ряда с анти-пролиферативным и антимитотическим действием, подавляет синтез нуклеиновых кислот, изменяет клеточные функции в результате связывания с липидами клеточных мембран. Циклофосфан входит в схемы противоопухолевой химио-терапии, обладает алкилирующим действием, нарушает синтез ДНК, митотическое деление клеток опухоли, вызывая их гибель. *A. fischeri* выращивали традиционным способом на агаризованной среде и методом глубинного культивирования. Эффективная концентрация препаратов была определена опытным путём и составила: для доксорубицина — 0,8 мг/мл, циклофосфана — 0,2 мг/мл исходной питательной среды. Изменение морфологии клеток регистрировали методами световой микроскопии. На всех фазах клеточного роста анализировали показатели роста, сохранения жизнеспособности бактерий и эмиссионные характеристики. Сочетанное применение УЗ и цитостатиков необратимо



подавляло клеточное деление и эмиссионную активность бактерий. Циклофосфан на 6 ч останавливал рост культуры, снижал в 2 раза интенсивность биолюминесценции выросшей популяции, а сочетанное действие УЗ и препарата приводило к полной супрессии эмиссионной активности фотобактерий. Доксорубин останавливал рост *A. fischeri* на 4 ч, в 2 раза снижал урожай клеток, а в комбинации с УЗ число выросших жизнеспособных клеток сокращалось в 4 раза, при этом регистрировали уменьшение в 1,5 раза эмиссионной активности люминесцирующих бактерий. Полученные данные могут свидетельствовать о возможности и перспективности применения химиотерапии на фоне физиотерапевтического УЗ воздействия. При этом без снижения терапевтического эффекта доза цитостатических и цитотоксических препаратов может быть снижена до 4 раз.

UDC 615.33+615.8

## POSSIBILITY OF RESPONDING CYSTOSTATIC EFFECT OF MEDICINAL PREPARATIONS ON CELLS

A. A. Oleshkevich, F. I. Vasilevich

Skryabin State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology (Moscow SAVMB)  
 Moscow, Russia. [komsotita@gmail.com](mailto:komsotita@gmail.com)

In the Moscow State Skryabin Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology the possibility of targeted delivery of drugs into living, proliferating, pre-sensitized target cells were investigated.

The combined and separate effects of continuous therapeutic intensity ultrasound (US), 0.4 W/cm<sup>2</sup>, and antitumor drugs: doxorubicin and cyclophosphamide were studied on biosensors, bacterial culture of *Aliivibrio fischeri* 6. Doxorubicin is an anthracycline antibiotic with anti-proliferative and antimetabolic action, which inhibits the synthesis of nucleic acids, alters cellular functions because of binding to the lipids of cell membranes. Cyclophosphamide is included in the antitumor chemotherapy regimens, has an alkylating effect, disrupts DNA synthesis, mitotic division of tumor cells, causing their death. *A. fischeri* was grown in a traditional way on an agar medium and by a method of deep cultivation. The effective concentration of the preparations was determined experimentally and was: for doxorubicin – 0.8 mg/ml, cyclophosphamide – 0.2 mg/ml of the initial nutrient medium. The change in cell morphology was recorded by light microscopy. At all phases of cell growth, growth rates, viability of bacteria and emission characteristics were analyzed. The combined use of ultrasound and cytostatics irreversibly suppressed cell proliferation and the emission activity of bacteria. Cyclophosphan for 6 hours stopped the growth of culture, reduced by 2 times the intensity of bioluminescence of the growing population, and the combined effect of US and the drug led to a complete suppression of the emission activity of photobacteria. Doxorubicin stopped the growth of *A. fischeri* for 4 hours, reduced the yield of cells by a factor of 2, and in combination with ultrasound, the number of viable cells increased 4-fold, while the emission activity of luminescing bacteria decreased by 1.5 times. The data obtained may indicate the possibility and prospects of using chemotherapy against the background of physiotherapeutic ultrasound. At the same time, without reducing the therapeutic effect, the dose of cytostatic and cytotoxic drugs can be reduced up to 4 times.

УДК 577.1

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Н.Л. Клячко<sup>1,2</sup>, М.Ж. Ханей<sup>2</sup>, Y. Zhao<sup>2</sup>, R. Gupta<sup>2</sup>, И.М. Ле-Дейген<sup>1</sup>, Е.О. Куценко<sup>1</sup>, Z. He<sup>2</sup>, Т. Patel<sup>2</sup>, А. Piroyan<sup>2</sup>, М. Sokolsky<sup>2</sup>, А.В. Кабанов<sup>1,2</sup>, Е.В. Batrakova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 11

<sup>2</sup> University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA  
 e-mail: [klyachko@enzyme.chem.msu.ru](mailto:klyachko@enzyme.chem.msu.ru)

Работа выдвигает на первый план наши последние разработки в области систем доставки лекарственных средств на основе экзосом для использования терапевтических средств этого типа для лечения нейродегенеративных заболеваний и рака.

**Ключевые слова:** каталаза, экзосомы, нейровоспаления, окислительный стресс, гематоэнцефалический барьер, болезнь Паркинсона

Экзосомы, природные наноразмерные везикулы, которые привлекли значительное внимание в качестве средств доставки лекарств в течение последних нескольких лет. Экзосомы состоят из природных липидных бислоев с обилием адгезионных белков, которые легко взаимодействуют с клеточными мембранами. Мы полагаем, что экзосомы, секретируемые моноцитами и макрофагами могут обеспечить беспрецедентную возможность избежать захвата мононуклеарными фагоцитами (как часть иммунной системы хозяина), и в то же время улучшают доставку включенных лекарственных препаратов в клетки-мишени, в конечном счете увеличивая лекарственную терапевтическую эффективность. В свете этого, мы разработали новую на основе экзосом систему доставки мощного антиоксиданта, каталазы, для лечения болезни Паркинсона (PD). Каталазу загружали в экзосомы *ex vivo* с использованием различных методов: инкубации при комнатной температуре, пермеабиллизацию мембраны с помощью сапонина, циклов замораживания-оттаивания, обработки ультразвуком, или экструзии. Размер полученных «каталаза-нагруженных» экзосом (exoCAT) находился в диапазоне 100 - 200 нм. Реформирование экзосом после обработки ультразвуком и экструзией или пермеабиллизации с сапонином приводит к высокой эффективности загрузки каталазы, замедленного высвобождения, и сохранению каталазы против деградации под действием протеаз. Экзосомы легко захватываются нервными клетками *in vitro*. Значительное количество экзосом было обнаружено в головном мозге мыши (модель болезни Паркинсона) после интраназального введения. Было показано, что ExoCAT давала значительное нейропротекторное действие в *in vitro* и *in vivo* моделях болезни Паркинсона. В целом, формуляции на основе экзосом, содержащих каталазу, представляют перспективные системы и могут быть универсальной стратегией для лечения воспалительных и нейродегенеративных расстройств.

Работа была выполнена при поддержке грантов РФ-14-13-00731 и РФФИ 17-54-33027 (для НЛК, ИМЛ-Д, ЕОК и АВК) с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета, NIH 1R01 NS057748 (EVB), RR021937 (AVK).

УДК 577.1

## EXTRACELLULAR VESICLES FOR DRUG DELIVERY

**N.L. Klyachko<sup>1,2</sup>, M.J. Haney<sup>2</sup>, Y. Zhao<sup>2</sup>, R. Gupta<sup>2</sup>, E.G. Plotnikova<sup>1</sup>, I.M. Le-Deygen<sup>1</sup>, E.O. Kutsenok<sup>1</sup>, Z. He<sup>2</sup>, T. Patel<sup>2</sup>, A. Piroyan<sup>2</sup>, M. Sokolsky<sup>2</sup>, A.V. Kabanov<sup>1,2</sup>, E.V. Batrakova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Chemical Enzymology Department, Moscow, 119991, Leninskie Gory, 1-11, Russia

<sup>2</sup> University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA  
e-mail: klyachko@enzyme.chem.msu.ru

The work highlights our recent developments in exosome-based drug delivery systems for using this type of therapeutic for treatment of neurodegenerative disorders and cancer.

**Key words:** catalase, exosomes, neuroinflammation, oxidative stress, blood–brain barrier, Parkinson’s disease

Exosomes are naturally occurring nanosized vesicles that have attracted considerable attention as drug delivery vehicles in the past few years. Exosomes are comprised of natural lipid bilayers with the abundance of adhesive proteins that readily interact with cellular membranes. We posit that exosomes secreted by monocytes and macrophages can provide an unprecedented opportunity to avoid entrapment in mononuclear phagocytes (as a part of the host immune system), and at the same time enhance delivery of incorporated drugs to target cells ultimately increasing drug therapeutic efficacy. In light of this, we developed a new exosomal-based delivery system for a potent antioxidant, catalase, to treat Parkinson’s disease (PD). Catalase was loaded into exosomes *ex vivo* using different methods: the incubation at room temperature, permeabilization with saponin, freeze-thaw cycles, sonication, or extrusion. The size of the obtained catalase-loaded exosomes (exoCAT) was in the range of 100 - 200 nm. A reformation of exosomes upon sonication and extrusion, or permeabilization with saponin resulted in high loading efficiency, sustained release, and catalase preservation against proteases degradation. Exosomes were readily taken up by neuronal cells *in vitro*. A considerable amount of exosomes was detected in PD mouse brain following intranasal administration. ExoCAT provided significant neuroprotective effects in *in vitro* and *in vivo* models of PD. Overall, exosome-based catalase formulations have a potential to be a versatile strategy to treat inflammatory and neurodegenerative disorders.

This study was supported in part by RSF-14-13-00731, RFBR 17-54-33027 grants (to NLK, IML-D, EOK, AVK) and M.V. Lomonosov Moscow State University Program of Development, and by the US NIH grants 1R01 NS057748 (to EVB), RR021937 (to AVK).

УДК 615.3

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ГИБРИДНОГО БЕЛКА ИНСУЛИНА АСПАРТ

Полудин А.Е., Васина Т.А., Гусаров Д.А., Буровик Д.А.

ООО «Герофарм»  
 142279, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск  
 E-mail: poludin@list.ru

В статье описывается технологический процесс выделения РБ из ТВ E.coli, с последующей очисткой гибридного белка инсулина аспарт.

**Ключевые слова:** аспарт, очистка гибридного белка инсулина аспарт, аналоги инсулина.

Больные сахарным диабетом второго типа спустя некоторое время вынуждены переходить от таблеток, снижающих сахар крови, к инъекциям гормона инсулина. Но инсулин человека, как было показано, не идеально имитирует гликемический профиль в организме пациента, страдающего диабетом. Аналоги инсулина изменяют время действия человеческого гормона для обеспечения индивидуального физиологического подхода к терапии и максимального удобства для пациента, страдающего диабетом. Препараты дают возможность достичь оптимального баланса между рисками перепада уровня сахара крови и достижением целевого показателя гликемии.

Один из аналогов инсулина – аспарт. Этот аналог инсулина способен практически идеально имитировать адекватный инсулиновый ответ на употребление пищи. Его короткий срок действия обуславливает относительно слабый эффект между принятием пищи, что и дает возможность получить максимально полный контроль над сахаром крови.

Цель нашего исследования – разработка технологии выделения и очистки аспарта.

Во всех производственных прогонах использовали тельца включения, полученные на заводе ООО «Герофарм» (Оболенск, Россия) в ходе промышленных ферментаций штамма-продуцента на основе E.coli BL21.

Технологический процесс получения рекомбинантного белка (РБ) включал процесс денатурации (выделение телец включения), содержащих РБ, растворенных в хаотропных условиях и восстановление дисульфидных связей. Использовали буфер на основе мочевины и дитиотреитола.

Затем с помощью процесса ренатурации РБ фолдировали белка в третичную структуру с одновременным нативным замыканием дисульфидных связей. Ренатурацию проводили путем инкубации в буферном растворе на основе пропиленгликоля и тиолатных анионов. По окончании процесса чистота нативной формы составляла 60 %.

Очистку гибридного белка проводили с помощью катионообменной хроматографии. Выход после хроматографии составил 90±5% и чистота более 65%.

В дальнейшем использовали полученный очищенный гибридный белок аспарта для процессинга его в инсулин-аспарт с помощью стадий ферментативного расщепления и последующей тонкой очистки.

Литература.

1. Овчинников Ю. А. / Биоорганическая химия // Москва «Просвещение» 1987.-816 с.
2. Гусаров Д.А., Гусарова В.Д., Баирамшвили Д.И., Миронов А.Ф., Генно-инженерный инсулин и его фармацевтические аналоги, Биомедицинская химия, 2008, том: 54(6), 624-642.
3. Sanger F. / Chemistry of insulin // Science 1959.V.129, P.1340-1344

UDC 615.3

## ISOLATION AND SEPARATION OF THE INSULIN ASPART FUSION PROTEIN

Poludin A. E., Vasina T. A., Gusarov D. A., Burovik D.A.

"GEROPHARM"  
 142279, Moscow region, Serpukhov district, Obolensk  
 E-mail: poludin@list.ru

The article describes the technological process of RB isolation from E. coli TV and subsequent purification of the insulin aspart hybrid protein.

**Key words:** aspart, purification of insulin protein aspart, insulin analogues.

Patients with type 2 diabetes with time are forced to switch from blood sugar lowering tablets to injections of the hormone insulin. However human insulin was shown to have not ideal capabilities to mimic the glycemic profile in the body of patients suffering from diabetes. On the other hand, insulin analogues provide better physiological respond and more convenient for patients. Such preparations make it possible to achieve an optimal balance between the risks of blood sugar level and the achievement of the target glycemia.

One of the insulin analogues is insulin aspart. This analogue is able to simulate an ideal insulin response to eating. Its short duration of action causes a relatively weak effect between meals, which makes it possible to get the most complete control over blood sugar level.

The main goal of our research is the development of the technology for isolation and separation of insulin aspart.

In all production runs, inclusion bodies obtained from Geropharm production facilities (Obolensk, Russia) during industrial fermentations of the producer strain E.coli BL21 were used.

The technological process of isolation of the fusion protein (FP) consists of unfolding procedure (isolation from inclusion bodies) with chaotropic and reduction agents.

Further, the isolated unfolded protein was undergone refolding process by means of dilution with refolding buffer containing propylene glycol and thiolate anions. At the end of the process, the purity of native monomeric form was achieved as 60%.

Purification of the fusion protein was performed by cation exchange chromatography. The yield of the chromatography was  $90 \pm 5$  % and the purity was more than 65 %.

In the further research, the resulting purified fusion protein was used to process it into insulin aspart by means of enzymatic cleavage steps and subsequent final purification.

#### References:

1. Ovchinnikov Y. A. /Bioorganic chemistry // Moscow "Prosveshchenie" 1987.-816 p.
2. Gusarov DA, Gusarova VD, Bairamashvili DI, Mironov AF, Genetically Engineered Insulin and Its Pharmaceutical Analogues, Biomedical Chemistry, 2008, vol. : 54 (6), 624-642.
3. Sanger F. / Chemistry of insulin / Science 1959. V.129, p.1340-1344.

УДК 615.277.3

## **ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ PICHIA PASTORIS И СПОСОБ ЕГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

**Калинина А. Н., Савельев Н. С., Хохлачёв Н. С.**

ООО «Скайбиохим» ГК «Скайград»

141090, Московская обл., г. Королёв, мкр. Юбилейный, ул. Маяковского, д. 2

e-mail: nsavelev21@gmail.com

Секретируемая экспрессия человеческого АФП была осуществлена на штамме дрожжей *Pichia pastoris* под контролем индуцибельного промотора АОХ. Был осуществлен подбор условий для культивирования на колбах. В результате культивирования отобранного штамма на колбах содержание АФП в культуральной жидкости составило 70-80 мг/л, что существенно выше достигнутого ранее уровня.

**Ключевые слова:** альфа-фетопротеин; АФП; *Pichia pastoris*; ферментация.

Альфа-фетопротеин (АФП) - основной компонент эмбриональной сыворотки крови млекопитающих, который синтезируется висцеральной эндодермой желточного мешка и клетками эмбриональной печени. Сразу после рождения уровень АФП в сыворотке резко снижается, и его экспрессия практически не определяется у взрослых. АФП обладает рядом функциональных свойств, которые в настоящее время интенсивно исследуются. Классические представления об АФП как об аналоге эмбрионального сывороточного альбумина в настоящее время дополняются данными о способности АФП осуществлять регуляцию роста, развития и запрограммированной гибели клеток [1]. В частности, было показано, что АФП способен подавлять рост эстроген-зависимых опухолевых и нормальных тканей.

Следует отметить, что применение природного АФП в качестве лекарственного средства технологически невозможно из-за дефицита сырья и ограничения по применению продуктов животного происхождения в фар-

миндустрии. Таким образом, актуальной задачей является разработка рекомбинантных штаммов-продуцентов АФП. На сегодняшний день существуют данные о экспрессии АФП в клетках *E. coli*, *S. cerevisiae* и *P. pastoris*. Следует отметить, что описанные ранее штаммы-продуценты обладают рядом недостатков: низкий выход (максимальный выход АФП был получен на клетках *P.pastoris* и составляет 2 мг/л), необходимость очистки и рефолдинга (в случае использования бактериальных экспрессионных систем).

В настоящее время существует большая потребность в разработке новых рекомбинантных штаммов, обладающих способностью к повышенной продукции рекомбинантного АФП человека за счет повышенной экспрессии гетерологичного белка с обеспечением внутриклеточной сборки нативной третичной структуры и последующей секреции целевого продукта в культуральную жидкость.

В ходе данной работы, секретируемая экспрессия человеческого АФП была осуществлена на штамме дрожжей *Pichia pastoris* под контролем индуцибельного промотора АОХ. Было осуществлен подбор условия для культивирования на колбах. В результате культивирования отобранного штамма на колбах содержание АФП в культуральной жидкости составило 70-80 мг/л, что существенно выше достигнутого ранее уровня.

Полученный белок решает задачу получения сырья для одного из главных проектов нашей организации - разработки технологии получения нового препарата белково-векторной доставки актиномицинового ряда, применяемого в борьбе с онкологическими заболеваниями. Рекомбинантный альфа-фетопротеин. является белковым вектором, обеспечивающим целенаправленную доставку препарата к онкоклеткам, что приводит к накоплению препарата в опухолевой ткани и существенному снижению лекарственной нагрузки на организм пациента. Лекарство получило коммерческое название «Афотид» и с успехом прошло доклинические испытания на животных. В 2018 году стартовала первая фаза клинических испытаний препарата.

На полученный штамм *P. pastoris* AFP-1 была подана патентная заявка и он был задепонирован в ВКПМ в качестве продуцента АФП. В ходе дальнейшей работы на его основе планируются разработка протокола культивирования на ферментерах объемом от 5 л и опытно-промышленное производство АФП.

#### Литература.

1 Mizejewsky G. J. *Biological role of a-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy*// *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2002. № 2. P. 89-115.

UDC 615.277.3

## HIGH EFFECTIVE RECOMBINANT STAMP OF THE HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN ON THE BASIS OF YEAST PICHIA PASTORIS AND THE METHOD OF ITS CULTIVATION

**Kalinina A. N., Savelev N. S., Hohlachev N.S.**

LLC Skybiochim -Skygrad  
 ООО «Скайбиохим» ГК «Скайград»  
 141090, Moscow region, Korolev, Yubileinny, Mayakovskogo str,2  
 e-mail: nsavelev21@gmail.com

Alpha-fetoprotein (AFP) is the main component of mammalian embryonic blood serum, which is synthesized by the visceral endoderm of the yolk sac and the cells of the embryonic liver. Immediately after birth, the serum AFP level drops sharply, and its expression is almost not determined in adults. AFP has a number of functional properties, which are currently being intensively studied. Classical ideas about AFP as an analogue of embryonic serum albumin are now supplemented by data on the ability of AFP to regulate growth, development, and programmed cell death [1]. In particular, it has been shown that AFP is able to suppress the growth of estrogen-dependent tumor and normal tissues.

It should be noted that the use of natural AFP as a drug is technologically impossible due to a shortage of raw materials and restrictions on the use of animal products in the pharmaceutical industry. Thus, the actual task is the development of recombinant AFP-producing strains. To date, there are data on the expression of AFP in *E. coli*, *S. cerevisiae* and *P. pastoris* cells. It should be noted that the previously described producer strains have a number of disadvantages: low yield (the maximum yield of AFP was obtained on *P. pastoris* cells and is 2 mg / l), the need for purification and refolding (in the case of using bacterial expression systems).

At present, there is a great need for the development of new recombinant strains having the ability to increase the production of recombinant human AFP due to increased expression of the heterologous protein, providing intracellular assembly of the native tertiary structure and subsequent secretion of the desired product into the culture liquid.

In this work, the secretion of human AFP expression was performed on a *Pichia pastoris* yeast strain under the control of an inducible AOX promoter. The selection of the condition for cultivation on flasks was carried out. As a result of cultivation of the selected strain on flasks, the content of AFP in the culture liquid was 70-80 mg / l, which is significantly higher than the level reached previously.

The resulting protein solves the problem of obtaining raw materials for one of the main projects of our organization - the development of technology for obtaining a new protein-vector delivery of actinomycin series, used in the fight against cancer. Recombinant alpha-fetoprotein. is a protein vector that provides a targeted delivery of the drug to the oncocytes, which leads to accumulation of the drug in the tumor tissue and a significant reduction in the drug load on the patient's body. The drug was given the commercial name "Afotid" and preclinical tests on animals were successfully performed. In 2018, the first phase of clinical trials of the drug was started.

The obtained strain of *P. pastoris* AFP-1 was filed with a patent application and it was deposited in RCIM as an AFP producer. In the course of further work on its basis, the development of a protocol for cultivation on fermenters with a volume of 5 l and experimental production of AFP are planned.

#### References:

1 Mizejewsky G. J. *Biological role of a-fetoprotein in cancer: prospects for anticancer therapy*// *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2002. № 2. P. 89-115.

УДК 577.1, ББК 28с

## ГИБРИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ

М.В.Ефремова <sup>1</sup>, А.С.Гаранина <sup>1</sup>, В.А.Науменко <sup>3</sup>, М.А.Абакумов <sup>4</sup>, U.Wiedwald <sup>5</sup>, А.Г.Мажуга<sup>6</sup>, Н.Л.Клячко <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, efremova33@mail.ru, +79263406985

<sup>2</sup> Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Россия, 119049, Москва, Ленинский проспект, 4, nauhenko.vict@gmail.com, +79161867801

<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Россия, 117997, Москва, Островитянова, 1, abakumov1988@gmail.com,

<sup>4</sup> Faculty of Physics and Center for Nanointegration Duisburg-Essen, University of Duisburg-Essen, Germany, 47057, Duisburg, Lotharstrasse, 1, ulf.wiedwald@uni-due.de,

<sup>5</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Россия, 125047, Москва, Миусская пл., 9, alexander.majouga@gmail.com,

Гибридные наночастицы магнетит-золото гантелевидной структуры исследованы в качестве платформы для тераностики. Физические свойства объемного материала, стабильность в водной среде, а также двойная функционализация поверхности делают данные наночастицы привлекательными для применения в гипертермии, магнитно-резонансной томографии, а также доставке лекарств.

**Ключевые слова:** наночастицы магнетит-золото, физико-химическое исследование, гипертермия, магнитно-резонансная томография, доставка лекарств

Идея создания гибридного материала на основе НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au заключается в сохранении перспективных свойств НЧ магнетита и золота, а также в наличии двух типов поверхности, отличающихся по химическим свойствам. Последняя особенность ведет к многофункциональности – полученный гибридный материал может быть одновременно связан с лекарственными и векторными молекулами, взаимно усиливать эффект магнитной и фотоиндуцированной гипертермии, а также использован для магнитно-резонансной и компьютерной томографии.

НЧ магнетит-золото синтезировали путем разложения пентакарбонила железа на поверхности сферических НЧ золота. В результате были получены так называемые гантелевидные структуры – попарно связанные между собой на границе раздела фаз НЧ золота и магнетита, в состав которых входят НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> размером 25±5 нм с формой, близкой к октаэдрической, и сферические НЧ золота диаметром 9±2 нм. В результате структурного исследования установлен эпитаксиальный рост НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> на поверхности НЧ Au, а также высокое качество кристаллической структуры в целом. НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> обладают магнитными свойствами объемного материала: намагниченность насыщения составляет 96.0 (86.0) Ам<sup>2</sup>/кг Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> при 5 К (300 К), а также на ZFC/FC кривых намагниченности наблюдается перегиб при температуре TV = 123 К, что свидетельствует о высокой стехиометричности магнетита.

НЧ были переведены в водную фазу при помощи производного фосфолипида и полиэтиленгликоля DSPE-PEG-COOH, после чего была подтверждена их стабильность в воде, PBS-буфере, а также клеточных средах. Были получены рекордные характеристики образца как для гипертермии (удельная мощность тепловыделения SLP составила более 600 Вт/г), так и как контрастного агента для магнитно-резонансной томографии (R2-релаксивность, равная 494 мМ<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> и превышающая аналогичные характеристики коммерческих контрастных агентов).

В работе было показано, что НЧ проходят через мембрану клеток аденокарциномы молочной железы мыши 4T1, и при этом они нетоксичны вплоть до концентраций 0.333 мг/мл. После 48 ч инкубации, ≈40% НЧ поглощаются клетками по данным атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС). При внутривенном введении мышам с привитыми опухолями 4T1, в течение часа после инъекции НЧ проникают из сосудов в ткань опухоли, пассивно накапливаются в ней вследствие EPR - эффекта, и до 3% НЧ удерживается в опухоли в течение суток после инъекции (данные АЭС). При этом возможна успешная визуализация опухоли методом МРТ.

Наиболее важным результатом работы является двойная функционализация поверхности гантелевидных НЧ флуоресцентной меткой Су5 (на НЧ золота), а также лекарством доксорубицином, либо гидрофобным флуоресцентным красителем нильским красным (загруженными в полимерную оболочку на НЧ магнетита). Показано, что в обоих случаях система может быть успешно доставлена в клетки 4T1 как *in vitro*, так и *in vivo*, при этом наблюдается высвобождение доксорубицина/ нильского красного с поверхности НЧ.

- Синтезированы наночастицы (НЧ) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au размером 25 нм октаэдрической формы со свойствами объемного материала
- НЧ стабильны в водных средах, нетоксичны и накапливаются внутри клеток опухоли молочной железы мыши 4T1 *in vitro*
- В течение часа после инъекции *in vivo*, НЧ проникают из сосудов в ткань опухоли 4T1 и пассивно накапливаются в ней
- Флуоресцентно-меченые НЧ обладают высокой R2-релаксивностью в МРТ и могут быть загружены лекарственным препаратом.

**Финансирование:** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-33-01232 (синтез наночастиц магнетит-золото и изучение МРТ-контрастных свойств), Министерства образования и науки РФ в рамках программы повышения конкурентоспособности НИТУ "МИСиС" № К2-2018-008 (магнитная гипертермия), а также при поддержке гранта РФФИ № 14-13-00731 (влияние переменного магнитного поля)

UDC 577.1, BBC 28c

## HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES: NEW POSSIBILITIES FOR THERANOSTICS

M.Efremova <sup>1</sup>, A.Garanina <sup>1</sup>, V.Naumenko <sup>3</sup>, M.Abakumov <sup>4</sup>, U.Wiedwald <sup>5</sup>, A.Majouga <sup>6</sup>, N.Klyachko <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Russia, 119991, Moscow, Leninskiye Gory, 1

<sup>3</sup> National University of Science and Technology "MISIS", Russia, 119049, Moscow, Leninsky prospect, 4

<sup>4</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Russia, 117997, Moscow, Ostrovityanova, 1

<sup>5</sup> Faculty of Physics and Center for Nanointegration Duisburg-Essen, University of Duisburg-Essen, Germany, 47057, Duisburg, Lotharstrasse, 1

<sup>6</sup> D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Russia, 125047, Moscow, Miusskaya pl., 9

Hybrid magnetite-gold nanoparticles with dumbbell structure are explored as a platform for theranostics. The physical properties of bulk material, stability in the water phase and dual surface functionalization make these nanoparticles attractive for the application in hyperthermia, magnetic resonance imaging as well as drug delivery.

**Key words:** magnetite-gold nanoparticles, physical-chemical investigation, hyperthermia, magnetic resonance imaging, drug delivery

The idea of hybrid material based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au NPs lies in the preserving of magnetite and gold NPs promising properties and also in the presence of two types of surfaces that differ in chemical properties. The latter feature leads to multifunctionality - the resulting hybrid material can be simultaneously associated with drug and vector molecules, mutually reinforce the effect of magnetic and photoinduced hyperthermia, and also used for magnetic resonance and computed tomography.

Magnetite-gold NPs were synthesized by decomposition of iron pentacarbonyl on the surface of spherical gold NPs. As a result, the so-called dumbbell structures with pairwise connected at the interface gold and magnetite NPs,

were obtained. They consisted of octahedral-like Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs with 25 ± 5 nm size and spherical Au NPs of 9 ± 2 nm diameter. As a result of the structural study, the epitaxial growth of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs on Au surface was established, as well as the high quality of crystal structure as a whole. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs have magnetic properties of bulk material: the saturation magnetization is 96.0 (86.0) Am<sup>2</sup>/kg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> at 5 K (300 K), and the ZFC / FC magnetization curves exhibit a kink at a temperature T<sub>V</sub> = 123 K, which indicates a high stoichiometry of magnetite .

NPs were transferred to water phase with the help of phospholipid and polyethylene glycol derivative DSPE-PEG-COOH, after which their stability in water, PBS buffer, and also cell media was confirmed. The record characteristics of the sample were obtained both for hyperthermia (the specific loss power SLP was more than 600 W/g) and as a contrast agent for magnetic resonance imaging (R<sub>2</sub>-relaxivity was equal to 494 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> and exceeded the similar characteristics of commercial contrast agents).

It is demonstrated that NPs pass through the membrane of murine breast adenocarcinoma 4T1 cells, and they are nontoxic up to 0.333 mg/ml concentration. After 48 hours of incubation, ≈40% of NPs are uptaken by cells according to atomic emission spectroscopy (AES) data. When intravenously administered to mice with grafted 4T1 tumors, within an hour after injection, NPs penetrate from the vessels into the tumor tissue, passively accumulate in it due to the EPR-effect, and up to 3% LF is retained in the tumor within 24 hours after injection (AES data). In this case, a successful imaging of the tumor by MRI is possible.

The most important result of the work is so-called double functionalization of dumbbell NPs surface with Cy5 fluorescent label (on gold NP), as well as the drug doxorubicin, or hydrophobic fluorescent Nile Red dye (loaded into a polymer shell on magnetite NPs). It is shown that in both cases the system can be successfully delivered to 4T1 cells both in vitro and in vivo, with doxorubicin / Nile red release from the NPs surface being observed.

- Octahedral-like 25 nm-sized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au nanoparticles (NPs) with the properties of bulk material were synthesized
- NPs are stable in aqueous media, non-toxic and accumulate inside murine breast adenocarcinoma 4T1 cells in vitro
- Within an hour after in vivo injection, NPs penetrate from the vessels into the 4T1 tumor tissue and passively accumulate in it
- Fluorescently-labeled NPs have high R<sub>2</sub>-relaxivity in MRI and can be loaded with a drug.

**Grant:** The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research (RFBR) according to the research project № 18-33-01232 (synthesis of magnetite-gold nanoparticles and MRI contrast study), Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the framework of Increase Competitiveness Program of NUST «MISIS» №K2-2018-008 (magnetic hyperthermia) as well as Russian Science Foundation № 14-13-00731 (the effect of alternating magnetic field)

УДК 543

## ГИДРОТЕРМАЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ

Шпунтова Д.В. <sup>1</sup>, Вострикова А.М. <sup>1</sup>, Бакал А.А. <sup>1</sup>, Сухоруков Г.Б. <sup>2</sup>, Горячева И.Ю. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Саратовский государственный университет, Саратов, Россия

<sup>2</sup> Лондонский университет королевы Марии, Лондон, Великобритания

Бакалавр

Саратовский Государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт Химии, 410012, Саратов, Астраханская, 83

E-mail: daria.shpuntova@gmail.com

Полиэлектролитные микрокапсулы находят широкое применение в различных областях, включая биологию, биомедицину, материаловедение, катализ, фармацевтику, продукты питания, косметологию, диагностику.

**Ключевые слова:** флуоресцентные нанокompозитные микрокапсулы, полиэлектролиты, полиэлектролиты, адсорбция, инкапсулирование.

Отличительной особенностью полиэлектролитных микрокапсул является их многофункциональность, а именно возможность введения в полиэлектролитную оболочку органических молекул, неорганических наночастиц, функциональных белков, красителей, квантовых точек, ионов и др. Проницаемость оболочек может быть изменена внешними воздействиями, такими как оптическое излучение, магнитное поле, ультразвук, действие ферментов, механическая деформация. Данное свойство микрокапсул делает их управляемыми для доставки лекарств и других применений.

Целью работы явился синтез полиэлектролитных микрокапсул различного состава, их гидротермальная обработка и изучение их оптических свойств. Суть метода состоит в поочередной адсорбции из раствора поло-



жительно и отрицательно заряженных молекул полиэлектролитов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 16-13-10195) и МОН (проект 4.1063.2017/4.6).

UDC 543

## HYDROTHERMAL TREATMENT OF POLYELECTROLYTE MICROCAPSULES

Shpuntova D.V. <sup>1</sup>, Vostrikova A.M. <sup>1</sup>, Bakal A.A. <sup>1</sup>, Sukhorukov G.B. <sup>2</sup>, Goryacheva I.Yu. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Saratov State University, Saratov, Russia

<sup>2</sup> Queen Mary University of London, London, United Kingdom

Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, Institute of Chemistry, 410012, Saratov, Astrakhanskaya, 83 Bachelor

E-mail: daria.shpuntova@gmail.com

Polyelectrolyte microcapsules are widely used in various fields, including biology, biomedicine, materials science, catalysis, pharmaceuticals, food, cosmetology and diagnostics.

**Key words:** fluorescent nanocomposite microcapsules, polyelectrolytes, polyelectrolytes, adsorption, encapsulation.

A distinctive feature of polyelectrolyte microcapsules is their multifunctionality, namely the possibility of introducing into the polyelectrolyte shell organic molecules, inorganic nanoparticles, functional proteins, dyes, quantum dots, ions, etc. The permeability of shells can be changed by external influences such as optical radiation, magnetic field, ultrasound, the action of enzymes, mechanical deformation. This property of microcapsules makes them useful for drug delivery and other applications.

The aim of this work was the synthesis of polyelectrolyte microcapsules of various compositions, their hydrothermal treatment and the study of their optical properties. The essence of the method consists in successive adsorption from the solution of positively and negatively charged molecules of polyelectrolytes.

This work was supported by the RSF (project 16-13-10195) and the Ministry of Education and Science (project 4.1063.2017 / 4.6).

УДК 612.753 617-089.844

## ДЕЙСТВИЕ ЭРИТРОПОЭТИНА И НИЗКОЙ ДОЗЫ BMP-2 НА РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ В ЧЕРЕПНЫХ ДЕФЕКТАХ КРИТИЧЕСКОГО РАЗМЕРА У МЫШЕЙ

Карягина А.С. <sup>1,2,3</sup>, Орлова П.А. <sup>1</sup>, Манских В.Н. <sup>1,2</sup>, Кривокубов М.С. <sup>1</sup>, Манухина М.С. <sup>1</sup>, Струкова Н.В. <sup>1</sup>, Попонина М.С. <sup>1</sup>, Бартов М.С. <sup>1</sup>, Лунин В.Г. <sup>1,3</sup>, Громов А.В. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

119991, Москва, ул. Хохлова, стр. 40

<sup>3</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42

e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

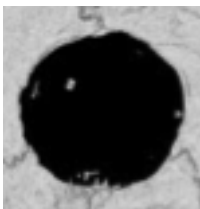
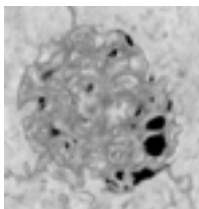
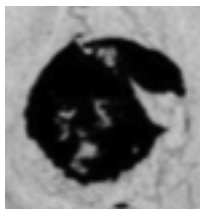
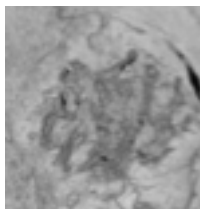



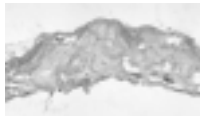
Инъекции эритропоэтина (ЭПО) человека способствуют быстрому формированию зрелой костной ткани в области черепных дефектов критического размера у мышей при одновременном введении низкой дозы BMP-2, иммобилизованного на деминерализованном костном матриксе (ДКМ).

**Ключевые слова:** эритропоэтин, BMP-2, индукция остеогенеза

Актуальность исследования определяется необходимостью снижения дозы BMP-2 в материалах для хирургии и стоматологии, поскольку высокие дозы BMP-2 могут являться причиной развития различного рода

осложнений. Снижение дозы BMP-2 без снижения эффективности может быть достигнуто за счет одновременного применения других факторов, способствующих остеоиндукции, одним из которых является ЭПО. Целью работы было изучение действия ЭПО на регенерацию костной ткани в модели черепных дефектов критического размера у мышей при совместном применении с иммобилизированным на ДКМ BMP-2 в низкой дозе.

В работе использовали коммерческий препарат Эпостим (эпоэтин бета, Фармапарк, Россия), полученный синтезом в *E. coli* BMP-2 и диски из ДКМ крупного рогатого скота размером 0,3 (толщина) x 3,5 (диаметр) мм. Контрольной группе имплантировали диски из ДКМ, опытной группе (ОГ) 1 – диски из ДКМ + 10 мкг BMP-2, ОГ 2 и 3 – диски из ДКМ с 1 мкг BMP-2, ОГ3, начиная со дня операции и еще 5 раза через два дня в область дефекта инъецировали по 1000 ед./кг ЭПО. Сразу после операции, а также через 3, 6, 9 и 12 недель проводили компьютерную томографию (КТ). Через 12 недель животных выводили из эксперимента, получали гистологические образцы и проводили гистоморфометрию.

Группа	КГ (n = 5)	ОГ1 (n = 5)	ОГ2 (n = 5)	ОГ3 (n = 5)
Томография; % новообразованной костной ткани				
	6,14±3,82	64,06±15,35	21,70±8,04	69,13±23,40
Гистология; % новообразованной костной ткани				
	10,32 ± 6,81	46,61 ± 13,02	22,93 ± 10,45	52,06 ± 11,11

На рисунке приведены данные на сроке 12 недель после операции. На общем виде дефекта по данным КТ в КГ и ОГ2 видны отдельные очаги костной ткани, в двух других группах – зарастание дефекта новообразованной костной тканью. Процент новообразованной костной ткани в группах ОГ1 и ОГ3 по данным КТ и гистоморфометрии значительно превышает соответствующие показатели для КГ и ОГ1, при этом между собой разница в группах ОГ1 и ОГ3 статистически недостоверна (критерий Манна-Уитни,  $p=0,05$ ). Аналогичная тенденция наблюдается и для других проанализированных параметров по КТ (площадь и объем костной ткани, число трабекул, объем закрытых пор) и гистоморфометрии (площадь костной ткани). Следует отметить существенное улучшение качества костной ткани в ОГ3 по сравнению с ОГ1 и 2: в области дефекта имеется хорошо развитая костная ткань, состоящая из сети костных балок с участками, имеющими строение нормального костного мозга и жировой ткани. Сравнение групп ОГ2 и ОГ3 демонстрирует достоверные различия по всем проанализированным параметрам. Таким образом, инъекционное введение эритропоэтина в сочетании с пониженной дозой BMP-2 приводит к образованию большего количества более развитой новообразованной кости по сравнению с обычной дозой BMP-2. Сочетанное использование обоих факторов перспективно с точки зрения возможности снижения концентрации BMP-2 в препаратах.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-15-00133).

UDC 612.753 617-089.844

## EFFECT OF ERYTHROPOETIN AND LOW DOSE BMP-2 ON BONE TISSUE REGENERATION IN CRITICAL SIZE CRANIAL DEFECTS MURINE MODEL

Karyagina A.S.<sup>1,2,3</sup>, Orlova P.A.<sup>1</sup>, Manskih V.N.<sup>1,2</sup>, Krivozubov M.S.<sup>1</sup>, Manukhina M.S.<sup>1</sup>, Strukova N.V.<sup>1</sup>, Poponova M.S.<sup>1</sup>, Bartov M.S.<sup>1</sup>, Lunin V.G.<sup>1,3</sup>, Gromov A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

123098, Moscow, Gamalei st., 18

<sup>2</sup> Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia  
119991, Moscow, Khokhlova st., 40

<sup>3</sup> All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia  
127550, Moscow, Timiryazevskaya st., 42

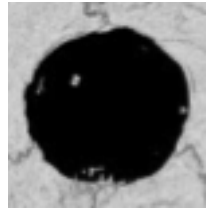
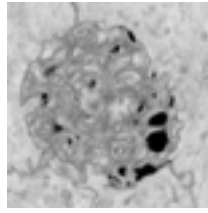
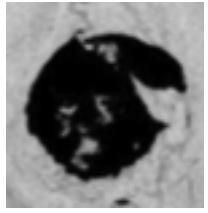
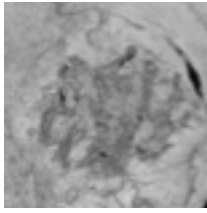



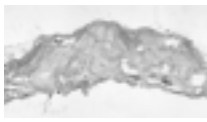
e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

Injections of human erythropoietin (EPO) stimulate rapid formation of mature bone tissue in critical size cranial defects murine model with the simultaneous administration of a low dose of BMP-2 immobilized on a demineralized bone matrix (DBM).

**Key words:** erythropoietin, BMP-2, induction of osteogenesis.

The relevance of the study is to reduce the dose of BMP-2 in bone grafts, since high doses of BMP-2 can cause various complications. Reduction of BMP-2 dose without decreasing its efficacy can be achieved by simultaneous application of other factors contributing to osteoinduction, one of which is EPO. The aim of the study was to study the simultaneous effect of EPO and low-dose BMP-2 immobilized on DBM on the regeneration of bone tissue in a critical size cranial defects murine model.

Epoetin beta (Epostim) was purchased from Pharmapark (Russia), BMP-2 was synthesized in *E. coli* and DBM discs of 0.3 (thickness) x 3.5 (diameter) mm were used. In control group DBM discs was implanted, in the experimental groups 1, 2 and 3 DBM discs with 10, 1 and 1 µg of BMP-2 were used, in experimental group 3 1000 ME/kg of EPO was injected in the defect area starting from the day of surgery and 5 more times once in two days. Immediately after the operation and at 3, 6, 9 and 12 weeks computer tomography (CT) was performed. After 12 weeks the animals were euthanized, histological specimens were obtained and histomorphometry was performed.

Group	CG (n = 5)	EG1 (n = 5)	EG2 (n = 5)	EG3 (n = 5)
Tomography; % of newly formed bone tissue				
	6,14±3,82	64,06±15,35	21,70±8,04	69,13±23,40
Histology; % of newly formed bone tissue				
	10,32 ± 6,81	46,61 ± 13,02	22,93 ± 10,45	52,06 ± 11,11

The figure shows the data for a period of 12 weeks after operation. According to CT data on the general view of the defect area in control group and experimental group 2, isolated loci of bone tissue are seen, in the other two experimental groups the overgrowth of the defect area by the newly formed bone tissue is observed. The percentage of newly formed bone tissue in the experimental groups 1 and 3 according to CT and histomorphometry is significantly higher than the corresponding values for control group and experimental group 1. The differences in the experimental groups 1 and 3 are statistically unreliable (Mann-Whitney test,  $p = 0.05$ ). A similar trend is observed for other analyzed parameters for CT (bone tissue area, bone tissue volume, trabeculae number, closed pores volume) and histomorphometry (bone tissue area). It should be noted a significant improvement in the quality

of bone tissue in experimental group 3 in comparison with experimental groups 1 and 2: a large volume of well-developed bone tissue is in the defect place. This bone tissue formed the network of bone trabeculas with typical bone marrow and fat cells between trabeculas. Comparison of experimental groups 2 and 3 demonstrates significant differences in all analyzed parameters. Thus, the injection of erythropoietin in combination with a reduced dose of BMP-2 leads to the formation of a larger quantity of a better quality new bone compared to the usual BMP-2 dose. The combined use of both factors is promising in terms of the possibility of reducing the concentration of BMP-2 in the preparations.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 16-15-00133).

УДК: 547.415.5:547.426.221.1:577.352.4, ББК: 24.234:24.239

## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ "СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ" НОВЫХ ФОЛАТ-СОДЕРЖАЩИХ ЛИПОКОНЬЮГАТОВ В СОСТАВЕ КАТИОННЫХ ЛИПОСОМ

Е.В.Шмендель <sup>1</sup>, Т.О.Кабилова <sup>2</sup>, Н.Г.Морозова <sup>1</sup>, М.А.Зенкова <sup>2</sup>, М.А.Маслов <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, РФ, 119571, Москва, проспект Вернадского, 86, [elena\\_shmendel@mail.ru](mailto:elena_shmendel@mail.ru), 89266576056

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, РФ, 630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8, ,

В данной работе описывается синтез серии фолат-содержащих липоконъюгатов, отличающихся длиной и природой спейсерной группы между гидрофобным доменом и адресным лигандом. Полученные липоконъюгаты были включены в состав катионных липосом в количестве от 0,5 до 2%. Адресные катионные липосомы были изучены как *in vitro*, так и *in vivo*. Для наиболее перспективных адресных липосом, содержащих полиэтиленгликольный спейсер, были подобраны условия адресной доставки и оптимальный состав катионных липосом.

**Ключевые слова:** Катионные липосомы, фолат-содержащие липоконъюгаты, фолиевая кислота, ПЭГ, адресная доставка

На сегодняшний день остается нерешенной проблема создания стабильных, безопасных, а главное, эффективных невирусных систем доставки терапевтических нуклеиновых кислот (НК). Однако, в нашей научной группе в 2012 году были разработаны катионные липосомы 2X3-DOPE, превосходящие по эффективности коммерчески доступный препарат Lipofectamine 2000 [1]. Главным недостатком таких систем доставки НК является отсутствие селективности к клеткам-мишеням. Известно, что на поверхности опухолевых клеток содержатся фолатные рецепторы, экспрессия которых повышена по сравнению со здоровыми клетками. Введение в состав катионных липосом фолат-содержащего липоконъюгата позволит решить проблему направленного переноса НК в опухолевые клетки. Целью данной работы является создание новых фолат-содержащих липоконъюгатов и изучение взаимосвязи «структура-активность».

Разработка оригинальной схемы синтеза и процедуры выделения фолат-содержащих липоконъюгатов, отличающихся длиной и природой спейсерных групп, позволила наработать адресные компоненты в количествах, достаточных для проведения биологических испытаний.

Фолат-содержащие липоконъюгаты были включены в состав катионных липосом с количестве от 0,5 до 2 %, мол. Изучение трансфицирующей активности проводилось на клеточных линиях НЕК 293 и KB-3-1, в которых наблюдалось повышенное содержание фолатных рецепторов [2]. В качестве объектов исследования были использованы короткие и протяженные НК (ODN, pEGFP, siRNA). Оказалось, что при низких соотношениях N/P (соотношение количества положительно заряженных атомов азота поликатионного амфифила 2X3 к количеству отрицательно заряженных фосфатных групп НК) рецептор-опосредованный эндоцитоз превалирует над электростатическим взаимодействием положительного заряда катионных липосом с отрицательно заряженной плазматической мембраной клетки. Таким образом, нами были обнаружены условия адресной доставки.

В условиях адресной доставки наиболее эффективным фолат-содержащим липоконъюгатом оказался липоконъюгат с полиэтиленгликольным спейсером, включенным в состав катионных липосом в количестве 2 %, мол.

Биораспределение *in vivo* комплексов адресных катионных липосом с siRNA также зависит от соотношения N/P. Так, при низких соотношениях (N/P 1/1) наблюдается высокий уровень удержания в организме мыши и, особенно, в опухоли ксенотрансплантата через 24 часа после введения (17% от общего сигнала флуоресценции).

В ходе проделанной работы 1) разработана оригинальная схема синтеза и процедура выделения фолат-содержащих липоконъюгатов; 2) найдены условия адресной доставки НК, при которых рецептор-опосредованный эндоцитоз превалирует над электростатическим взаимодействием; 3) выбран наиболее оптимальный количественный состав катионных липосом, в котором фолат-содержащий липоконъюгат находится в количестве 2 %; 4) изучена взаимосвязь «структура-активность» новых фолат-содержащих липоконъюгатов.

*Литература:*

1. Maslov MA, Kabilova TO, Petukhov IA, et al. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *Journal of Controlled Release*. 2012;160(2):182-193. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.023. 2. Kabilova TO, Shmendel E V., Gladkikh D V., et al. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel folate-equipped liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;123:59-70. doi:10.1016/j.ejpb.2017.11.010.

**Финансирование:** Выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках базовой части государственного задания 4.8861.2017/БЧ

UDC: 547.415.5:547.426.221.1:577.352.4, ББК: 24.234:24.239

## STUDY OF RELATIONSHIP "STRUCTURE-ACTIVITY" OF NEW FOLATE-CONTAINING LIPOCONJUGATES IN COMPOSITION OF CATIONIC LIPOSOMES

E.Shmendel <sup>1</sup>, T.Kabilova <sup>2</sup>, N.Morozova <sup>1</sup>, M.Zenkova <sup>2</sup>, M.Maslov <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow Technological University, Russia, 119571, Moscow, Vernadsky Ave., 86

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave., 8

A group of folate-containing lipoconjugates with spacers of various types and lengths between hydrophobic domain and target ligand was synthesized. The resulting lipoconjugates were included in the composition of cationic liposomes in an amount of 0.5 to 2%. Folate-containing cationic liposomes have been studied both in vitro and in vivo. For the most promising targeted liposomes containing polyethylene glycol spacer, the conditions of targeted delivery and the optimal composition of cationic liposomes were selected.

**Key words:** Cationic liposomes, folate-containing lipoconjugates, folic acid, PEG, targeted delivery

To date, the problem of creating stable, safe, and, most importantly, effective non-viral delivery systems of therapeutic nucleic acids (NAs) remains unsolved. However, in our scientific group in 2012, cationic liposomes 2X3-DOPE more effective than commercially available Lipofectamine 2000 was developed [1]. The main disadvantage of such NAs delivery systems is lack of selectivity into target cells. It is known that there are overexpressed of folate receptors on the surface of tumor cells compared to their expression in normal tissues. The introduction of a folate-containing lipoconjugates into composition of cationic liposomes will solve the problem of NAs targeted delivery into tumor cells. The purpose of this work is to create new folate-containing lipoconjugates and study the relationship "structure-activity".

The development of original synthesis scheme and isolation procedure of folate-containing lipoconjugates with spacers of various types and lengths made it possible to generate lipoconjugates in quantities sufficient for doclinical trials.

Folate-containing lipoconjugates were included in the composition of cationic liposomes in the amount of 0.5 to 2%, mol. The transfection activity was studied on the HEK 293 and KB-3-1 cell lines, in which an overexpression of folate receptors was observed [2]. ODN, pEGFP, siRNA were used as the objects of the study. At low N/P ratios (the ratio of the number of positively charged nitrogen atoms of polycationic amphiphile 2X3 to the amount of negatively charged phosphate groups of NAs), the receptor-mediated endocytosis prevails over the electrostatic interaction of positive charge cationic liposomes with negatively charge plasma membrane of the cell. Thus, we found the conditions of targeted delivery.

In conditions of targeted delivery, the most effective folate-containing lipoconjugate was lipoconjugate with a polyethylene glycol spacer included in composition of cationic liposomes in an amount of 2%, mol.

In vivo, bioavailability of targeted cationic liposomes/siRNA complexes also depends on the N/P ratios. Thus, at low ratios (N/P 1/1) there is high retention in the mouse body and, especially, in the xenograft tumor 24 h after administration (17% of total fluorescence signal).

In the course of the work: 1) an original synthesis scheme and isolation procedure of folate-containing lipoconjugates was developed; 2) the conditions of NA targeted delivery in which the receptor-mediated endocytosis prevails over electrostatic interaction was founded; 3) the most optimal quantitative composition of cationic liposomes in which the folate-containing lipoconjugate is in the amount of 2% was chosen; 4) the relationship "structure-activity" of new folate-containing lipoconjugates was studied.

*References:*

1. Maslov MA, Kabilova TO, Petukhov IA, et al. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *Journal of Controlled Release*. 2012;160(2):182-193. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.023. 2. Kabilova TO, Shmendel E V, Gladkikh D V, et al. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel folate-equipped liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;123:59-70. doi:10.1016/j.ejpb.2017.11.010.

**Grant:** This research was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (4.8861.2017/BCh)

УДК 547.963.1

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУЦИНА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ НА ОСНОВЕ ВАТЕРИТА МИКРОКОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ МУКОЗАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА

Шолина Е.А., Филатова Л.Ю., Володькин Д.В., Балабушевич Н.Г.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3  
e-mail: sholina-katya@mail.ru

Мукоадгезивные микроконтейнеры с доксорубицином получены соосаждением антибиотика доксорубицина в присутствии и отсутствии муцина в ватеритные микросферы. Изучено влияние концентрации муцина на включение доксорубицина и его высвобождение.

**Ключевые слова:** ватерит; муцин; доксорубицин; микроконтейнеры; мукоадгезивные лекарственные формы.

В последние годы из неорганических соединений, имеющих перспективы биомедицинского применения, пристальное внимание уделяется ватеритной модификации карбоната кальция. Благодаря простоте получения, дешевизне, мягким условиям разрушения, а также высокой биосовместимости высокопористые микросферы ватерита могут быть успешно использованы в качестве микроконтейнеров с целью пролонгированного и контролируемого высвобождения биологически активных веществ (БАВ), а также для получения на их основе полиэлектролитных микрокапсул. Известно, что низкомолекулярные БАВ плохо включаются в микросферы и высвобождаются при промывках [1]. Для устранения этого недостатка используют введение биополимеров, способствующих лучшему связыванию БАВ в микросферах.

Муцины представляют собой класс высокомолекулярных гликопротеинов и имеют благодаря наличию сиаловых кислот отрицательный заряд в нейтральных и щелочных средах [2]. Муцины могут способствовать удерживанию низкомолекулярных БАВ в микросферах и обеспечивать мукоадгезивные свойства в составе микрочастиц за счет дополнительного взаимодействия со слизистыми оболочками.

В настоящее время продолжается разработка новых методов микро- и нанокапсулирования противоракового антрациклинового антибиотика доксорубицина (544 Да) для увеличения биодоступности и уменьшения токсического действия, в том числе с использованием ватерита и различных природных биополимеров [3].

Цель работы состояла в исследовании влияния муцина на включение доксорубицина в микросферы ватерита и его высвобождение в физиологических условиях.

Микросферы ватерита получали стандартным сливанием эквимольных растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Изучено соосаждение доксорубицина в микросферы ватерита в присутствии и отсутствии муцина из желудка свиньи. В присутствии муцина для микросфер наблюдали изменение поверхностного заряда от  $+(9 \pm 1)$  мВ до  $-(11 \pm 2)$  мВ, увеличение размера от 2-4 до 4-6 мкм и уменьшение размера нанокристаллитов, что свидетельствовало об уменьшении размера пор в частицах. Увеличение концентрации муцина от 0 до

4 мг/мл при соосаждении позволило в 10 раз увеличить включение доксорубина в микросферы за счет образования полиэлектролитного комплекса положительно заряженного антибиотика (рКа 8,6) с отрицательно заряженным гликопротеином (рI~3-4). Высвобождение доксорубина из микросфер в физиологических условиях существенно замедлялось с увеличением концентрации соосажденного муцина.

В работе впервые показано, что наличие муцина при формировании микросфер ватерита способствует увеличению включения доксорубина и уменьшению его высвобождения, что может быть важным при мукозальном применении ватеритных микроконтейнеров с положительно заряженными низкомолекулярными биологически активными веществами.

*Литература:*

1 Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A. Skirtach A.G., Volodkin D. *Macromol. Biosci.* 2015, 16, 95-105.

2 Bansi R., Turner B.S. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2006, 1, 164–170.

3 Bosio V.E., Cacicedo M.L., Calvignac B., Leon I., Beuquier T., Boury F., G.R. Castro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2014, 123, 158-169.

UDK 547.963.1

## THE USE OF MUCIN FOR RECEIVING BASED ON VATERITE MICROCONTAINERS FOR MUCOSAL DELIVERY OF DOXORUBICIN

**Sholina E.A., Filatova L.Y., Volodkin D.V., Balabushevich N.G.**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, Leninskiye gory 1-3, 119991 Moscow, Russia  
 e-mail: sholina-katya@mail.ru*

Mucoadhesive microcontainers with doxorubicin were prepared by co-precipitation of antibiotic doxorubicin into the vaterite microspheres in the presence and absence of mucin. The influence of mucin concentration on inclusion and release of doxorubicin were studied.

**Keywords:** vaterite, mucin, doxorubicin, microcontainers, mucoadhesive drugs.

In recent years among inorganic compounds, having the prospects of biomedical application, close attention is paid to the vaterite modification of calcium carbonate. Due to simplicity in production, cheapness, mild elimination conditions, and high biocompatibility, highly porous vaterite microspheres can be successfully used as microcontainers for prolonged and controlled release of biologically active substances (BAS) as well as for the preparation of polyelectrolyte microcapsules. It is known that low-molecular-weight BASs are poorly included into the microspheres and can release during washing [1]. To eliminate this drawback, introduction of biopolymers that promote better binding of BAS into the microspheres is used.

Mucins belong to a class of high-molecular-weight glycoproteins and have a negative charge in neutral and alkaline condition due to the presence of sialic acids [2]. Mucins can promote retention of low-molecular-weight BASs in microspheres and provide mucoadhesive properties due to additional interaction with mucosa.

At present, the development of new methods of micro- and nano-capsulation of anti-cancer anthracycline antibiotic doxorubicin (544 Da) in progress in order to increase bioavailability and reduce toxic effect. These methods are also based on using the vaterite and various natural biopolymers [3].

The aim of this work was to investigate the influence of mucin on doxorubicin inclusion into the vaterite microspheres and doxorubicin release under physiological conditions.

The vaterite microspheres were formed according to standard protocol based on mixing the equimolar solutions of CaCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The co-precipitation of doxorubicin in the vaterite microspheres in the presence and absence of mucin from the pig's stomach has been studied. The following changes in the properties of the microspheres were observed in the presence of mucin: a change in the surface potential from +(9 ± 1) mV to -(11 ± 2) mV, an increase in the size of microspheres from 2-4 to 4-6 μm, and a decrease in the size of the nanocrystallites (indicates a decrease in the pore size in the microspheres).. An increase in the concentration of mucin from 0 to 4 mg/ml during the co-precipitation made it possible to increase the inclusion of doxorubicin in the microspheres by 10 times due to a polyelectrolyte complex formed between the positively charged antibiotic (pKa 8.6) and the negatively charged glycoprotein mucin (pI~3-4). The release of doxorubicin from microspheres at physiological conditions significantly slowed down with an increase in the concentration of the co-precipitated mucin.

In this work for the first time it is shown that the presence of mucin during the formation of the vaterite microspheres enhances the inclusion of doxorubicin and reduces its release rate. This may be important in the

mucosal application of vaterite microcontainers with positively charged low-molecular-weight biologically active substances.

*References:*

- 1 Balabushevich N.G., Lopez de Guereñu A.V., Feoktistova N.A., Skirtach A.G., Volodkin D. *Macromol. Biosci.* 2015, 16, 95-105.
- 2 Bansi R., Turner B.S. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2006, 1, 164–170.
- 3 Bosio V.E., Cacicedo M.L., Calvignac B., Leon I., Beuvier T., Boury F., G.R. Castro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2014, 123, 158-169.

УДК: УДК 602.4:628.35:664

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БЕЗРЕАГЕНТНОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СОДЕРЖАНИЯ ГЛЮКОЗЫ В КРОВИ

**А.С.Харькова, В.А.Арляпов**

Тульский государственный университет, РФ, 300012, Тула, пр. Ленина, 92, Anyuta\_Zaytseva@mail.ru, 8-915-780-52-55

Разработан безреагентный биосенсор для определения глюкозы. Зафиксирован прямой перенос электронов от активного центра фермента глюкозооксидазы на угольно-пастовый электрод. Найдены основные электрохимические характеристики данного процесса.

**Ключевые слова:** биосенсор, фермент глюкозооксидаза, одностенные углеродные нанотрубки

Диагноз и лечение пациентов с сахарным диабетом требуют частый точный анализ уровня глюкозы в организме, в частности, для предотвращения гипогликемии (низкого уровня сахара в крови <3ммМ) [1]. В большинстве коммерческих тест-систем для определения глюкозы используются электрохимические биосенсоры на основе фермента глюкозооксидазы и медиаторов (как правило, металлоорганических соединений). Недостатком медиаторных биосенсоров можно считать то, что их нельзя использовать для многократного анализа или для постоянного мониторинга концентрации аналита. Для этих целей подходят «безреагентные» биосенсоры.

Для создания безреагентного биосенсора необходимо обеспечить прямой безмедиаторный перенос электронов от активного центра фермента на электрод. В случае фермента глюкозооксидазы прямой перенос электронов затруднен из-за того, что активный центр слишком глубоко погружен в белковую оболочку фермента [2]. Для того чтобы устранить данный недостаток используют различные наноматериалы, которые благодаря нанометрическим размерам должны приблизиться достаточно близко к активному центру фермента и, таким образом, «подключить» фермент к электроду, обеспечивая прямую передачу электрона, которая не может быть достигнута прямым туннельным эффектом [3]. Еще одним преимуществом биосенсоров на основе прямого переноса электронов является превосходство по характеристикам аналога [4].

Целью данной работы является разработка высокочувствительного биосенсора для определения глюкозы в крови на основе обеспечения прямого переноса электронов от активного центра фермента на электрод. Для формирования биосенсорной системы использовались три основных компонента: фермент глюкозооксидаза, выделенная из *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, США), биосовместимая матрица (на основе бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma-Aldrich, США) и хитозана (Sigma-Aldrich, США)) и угольно-пастовых электродов, поверхность которых модифицирована углеродными нанотрубками (НПФ «УГЛЕРОД ЧГ», Россия).

Методом циклической вольтамперометрии с помощью анализатора «Экотест-ВА» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия) был исследован прямой перенос электронов кофермента глюкозооксидазы на угольно-пастовый электрод. На вольтамперограмме имеются два пика анодный при -350 мВ и катодный -450 мВ, характерные для окислительно-восстановительной реакции кофермента. Установлен формальный потенциал исследуемой системы (-0,48 В) и гетерогенная константа скорости переноса электронов 0,6 см/с.

Дальнейшие исследования были сделаны в амперометрическом режиме при постоянном потенциале (-0,48В) для обеих матриц. Следует отметить, что нижняя граница при использовании матрицы БСА и хитозана схожи и составляют 0,2 ммМ. При этом стабильная работа фермента (более 20 суток) достигается при



использовании хитозана в качестве иммобилизующей матрицы.

Были проведены сравнительные испытания в крови и плазме крови стандартным методом и с использованием биосенсора на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной в гидрогель хитозана. Статистическая обработка результатов показала, что данные, полученные обоими методами, незначимо отличаются. Разработанный биосенсор можно использовать в качестве альтернативы стандартному анализу.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-74-10078)

1. В результате исследования процесса прямого переноса электронов от активного центра фермента на электрод установлено, что тип иммобилизующей матрицы не влияет на гетерогенную константу переноса электронов ( $k_s \sim 0,6$  см/с). 2. Выявлено, что при использовании хитозана в качестве матрицы для иммобилизации долговременная стабильность выше (более 20 суток), чем БСА. 3. Установлено, что по значению нижней границы определяемых концентраций разработанная система не уступает аналогам, а нижняя граница определяемых концентраций (0,2 мМ) позволяет проводить исследования низкого содержания сахара в крови.

Литература:

1. Zhu Z. et al. A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene //Sensors. 2012. V. 12. I. 5. PP. 5996-6022. 2. Mazar F. M. et al. Development of Novel Glucose oxidase Immobilization on Graphene/Gold nanoparticles/Poly Neutral red modified electrode //Process Biochemistry. 2017. V. 56. PP. 71-80. 3. De Poulpique A., Ciaccava A., Lojou E. New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells //Electrochimica Acta. 2014. V. 126. PP. 104-111. 4. Rafighi P., Tavahodi M., Haghighi B. Fabrication of a third-generation glucose biosensor using graphene-polyethyleneimine-gold nanoparticles hybrid //Sensors and Actuators B: Chemical. 2016. V. 232. PP. 454-461.

**Финансирование:** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №17-74-10078)

UDC 602.4:628.35:664

## USE OF NANOMATERIALS FOR THE DEVELOPMENT OF A REAGENTLESS BIOSENSOR FOR GLUCOSE DIAGNOSTIC IN BLOOD

A.Kharkova, V.Arlyapov

Tula State University, Tula, Russia, 300012, Tula, Lenin Avenue, 92

A reagentless biosensor for glucose determination was developed. Direct electron transfer between glucose oxidase enzyme active center and carbon-paste electrode was recorded. The main electrochemical characteristics of this process are found.

**Key words:** biosensor, glucose oxidase enzyme, single-walled carbon nanotubes

The diagnosis and treatment of patients with diabetes require frequent accurate analysis of the glucose level in the body, in particular, to prevent hypoglycemia (low blood sugar <3mM) [1]. Most commercial glucose test systems use electrochemical biosensors based on the glucose oxidase enzyme and mediators (usually organometallic compounds). The disadvantage of mediator biosensors is it's impossible to use in multiple analysis or for continuous monitoring of analyte concentrations. For these purposes, reagentless biosensors are suitable.

To create a reagentless biosensor, it is necessary to provide direct mediatorless electron transfer from the active center of the enzyme to the electrode. In the case of the glucose oxidase enzyme, the direct electron transfer not possible because the active site is deeply buried inside the enzyme [2].

In order to eliminate this limitation, different nanomaterials can be used because of its nanometric dimensions are supposed to go close enough to the buried active sites inside the protein to electronically wire the enzyme at the electrode and allow the electron transfer that cannot be achieved by direct tunneling effect [3]. Another advantage of biosensors based on direct electron transfer surpass its counterparts in performances [4].

The aim of this work is to develop a highly sensitive biosensor based on direct electron transfer from the active center of the enzyme to the electrode for blood glucose determining. Three main components were used to form the biosensor system: a glucose oxidase enzyme isolated from *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, USA), a biocompatible matrix (based on bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) and chitosan (Sigma-Aldrich, USA)) and carbon-paste electrodes, modified by carbon nanotubes (Ltd. "Carbon Chg", Russia).

Direct electron transfer from the coenzyme glucose oxidase to the carbon-paste electrode was investigated

by cyclic voltammetry using the analyzer Ecotest -VA (Ekoniks-Expert, Russia). On the voltammogram there are two peaks: anode at -350 mV and a cathode -450 mV, typical for oxidation-reduction reaction of coenzyme. The formal potential of studied system (-0.48 V) and the heterogeneous electron transfer rate constant of 0.6 cm/s are established.

Further studies were made in the amperometric mode at a constant potential (-0.48V) for both matrices. It should be noted that the minimum reporting level using the BSA and chitosan matrix are similar amount 0.2 mM. At the same time, long-term stability of the enzyme (more than 20 days) is achieved in system with chitosan.

Comparative tests were carried out in the blood and blood plasma by a standard method and using the biosensor based on glucose oxidase immobilized in a chitosan hydrogel. Statistical processing of experimental results showed that the data obtained by both methods are insignificantly different. The developed biosensor can be used as an alternative to standard analysis.

The study was carried out with funds from the Russian Science Foundation grant (project №17-74-10078)

1. As a result of studying the process of direct electron transfer from the active center of the enzyme to the electrode, it was established that the type of the immobilizing matrix does not affect the heterogeneous electron transfer constant rate ( $k_s \sim 0.6 \text{ cm} / \text{s}$ ). 2. It was found that with using chitosan for immobilization, long-term stability is higher (more than 20 days) than BSA system. 3. It has been established that the developed system is not inferior to analogues in the minimum reporting level (0.2 mM) that allows carry out analysis of low sugar content in the blood.

#### References:

1. Zhu Z. et al. A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: carbon nanotubes and graphene //Sensors. 2012. V. 12. I. 5. PP. 5996-6022.
2. Mazar F. M. et al. Development of Novel Glucose oxidase Immobilization on Graphene/Gold nanoparticles/Poly Neutral red modified electrode //Process Biochemistry. 2017. V. 56. PP. 71-80.
3. De Poulpique A., Ciaccafava A., Lojou E. New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells //Electrochimica Acta. 2014. V. 126. PP. 104-11.
4. Rafighi P., Tavahodi M., Haghghi B. Fabrication of a third-generation glucose biosensor using graphene-polyethyleneimine-gold nanoparticles hybrid //Sensors and Actuators B: Chemical. 2016. V. 232. PP. 454-461.

**Grant:** The study was carried out with funds from the Russian Science Foundation grant (project №17-74-10078)

УДК 606

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТО ТИПА «ГАНТЕЛЬ» В КАЧЕСТВЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ: IN VITRO И IN VIVO ИССЛЕДОВАНИЯ

Гаранина А. С.<sup>1,2</sup>, Ефремова М. В.<sup>1,2</sup>, Науменко В. А.<sup>1</sup>, Мельников П. А.<sup>3</sup>, Чехонин В. П.<sup>3,4</sup>, Савченко А. Г.<sup>1</sup>, Абакумов М. А.<sup>1,4</sup>, Wiedwald U.<sup>1,5</sup>, Мажуга А. Г.<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

<sup>2</sup> Химический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

<sup>3</sup> Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, Россия

<sup>4</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

<sup>5</sup> Faculty of Physics and Center for Nanointegration Duisburg-Essen, University of Duisburg-Essen, Duisburg, Germany

<sup>6</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
e-mail: anastasiacit@gmail.com

Получены наночастицы магнетит-золото типа «гантель», модифицированные флуоресцентным красителем и загруженные доксорубицином. Исследовано взаимодействие наночастиц с опухолевыми клетками и эффективность доставки лекарственного препарата в них in vitro. Изучено накопление наночастиц в опухоли после внутривенного введения in vivo.

**Ключевые слова:** наночастицы магнетит-золото, доксорубицин, клетки линии 4T1, интравитальная микроскопия, MPT, IVIS.

Использование многофункциональных наночастиц (НЧ) в медицине открывает новые возможно-

сти для терапии и ранней диагностики злокачественных образований [1]. К таким НЧ относятся частицы магнетит-золото типа «гантель» [2]. Они обладают магнитными свойствами, что позволяет применять их для магнитно-резонансной томографии (МРТ) и гипертермии, а также имеют две поверхности для возможных модификаций. Оба этих фактора делают данные НЧ перспективной платформой для тераностики злокачественных новообразований. В ходе работы синтезированы и охарактеризованы НЧ магнетит-золото типа «гантель». Работа проведена на клетках карциномы молочной железы мыши линии 4Т1. В качестве животного объекта исследования в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства высшего и среднего образования СССР от 13.11.1984г. №742) взяты половозрелые самки мышей породы BALB/c, весом порядка 20 грамм (возраст 8-10 недель). В работе использованы методы МТС-теста, флуоресцентной и сканирующей лазерной конфокальной микроскопии, интравитальной микроскопии, гемолитического ex vivo теста, МРТ и спектральной системы визуализации in vivo (IVIS). Исследование накопления НЧ в клетках показало, что уже через 30 мин инкубации клеток с НЧ последние обнаруживаются в околоядерной области. Установлено, что НЧ не оказывают токсического воздействия на клетки в широком диапазоне концентраций: не вызывают гемолиз, а также продукцию активных форм кислорода и гибель клеток линии 4Т1. Исследование доставки доxorубина, загруженного в НЧ, показало, что в первые 2 ч инкубации с клетками накопление препарата в среднем в 2 раза ниже, чем при культивировании со свободным доxorубином. Через 4 ч эта разница отсутствует. Исследования in vivo выявили, что при внутривенном введении НЧ в течение продолжительного времени циркулируют по кровеносным сосудам. За счет EPR-эффекта происходит постепенное накопление НЧ в опухоли, которое достигает максимума через 6 ч после инъекции. Методом МРТ как in vitro, так и in vivo показано, что исследуемые НЧ могут быть использованы в качестве контрастного агента. Таким образом, полученные НЧ магнетит-золото типа «гантель» не оказывают токсического влияния на клетки и могут быть использованы в качестве платформы для тераностики злокачественных образований. Также они являются превосходным контрастным агентом для МРТ.

*Литература:*

1. Cho K. J., Wang X., Nie S. M., Chen Z., Shin D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer // *Clinical Cancer Research* 2008. Vol. 14. P. 1310-1316.
2. Nan X., Zhang X., Liu Y., Zhou M., Chen X., Zhang X. Dual-Targeted Multifunctional Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging Guided Cancer Diagnosis and Therapy // *Acs Applied Materials & Interfaces* 2017. Vol. 9. №11. P. 9986-9995.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-33-01232.

UDK 606

## DUMBBELL MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES APPLICATION AS A PLATFORM FOR MALIGNANT TUMORS THERANOSTICS: IN VITRO AND IN VIVO INVESTIGATION

**Garanina A. S.**<sup>1,2</sup>, **Efremova M. V.**<sup>1,2</sup>, **Naumenko V. A.**<sup>1</sup>, **Melnikov P. A.**<sup>3</sup>, **Chekhonin V. P.**<sup>3,4</sup>, **Savchenko A. G.**<sup>1</sup>, **Abakumov M. A.**<sup>1,4</sup>, **Wiedwald U.**<sup>1,5</sup>, **Majouga A. G.**<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup> National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, Russia

<sup>2</sup> Faculty of Chemistry of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education "Lomonosov Moscow State University", Moscow, Russia  
119991, Moscow, GSP-1, Leninskiye Gory 1-3

<sup>3</sup> Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Faculty of Physics and Center for Nanointegration Duisburg-Essen, University of Duisburg-Essen, Duisburg, Germany

<sup>6</sup> D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

e-mail: anastasiacit@gmail.com

Dumbbell magnetite-gold nanoparticles, modified with a fluorescent dye and loaded with doxorubicin, were obtained. The interaction of nanoparticles with tumor cells and the drug delivery effectiveness were studied in vitro. The accumulation of nanoparticles in a tumor after intravenous injection was investigated in vivo.

**Keywords:** magnetite-gold nanoparticles, doxorubicin, 4T1 cell line, intravital microscopy, MRI, IVIS.

Multifunctional nanoparticles (NPs) application in medicine opens new possibilities in therapy and early diagnostics of malignant tumors [1]. Such NPs include dumbbell magnetite-gold particles [2]. They have magnetic properties, which allow them to be applied for magnetic resonance imaging (MRI) and hyperthermia, and also have two surfaces for possible modifications. Both these factors make NPs a promising platform for malignant tumors theranostics. In this study, dumbbell magnetite-gold NPs are synthesized and characterized. Mouse breast cancer 4T1 cell line is used. Mature females of BALB/c mice, weighing about 20 g (age 8-10 weeks), are taken as the animal object in accordance with the "Rules for the performance of work using experimental animals" (Appendix to the order of the Ministry of Higher and Secondary Education of the USSR of 13.11.1984 No. 742). The methods of MTS-test, fluorescence and scanning laser confocal microscopy, intravital microscopy, hemolytic ex vivo test, MRI and spectrum in vivo imaging system (IVIS) are used in the study. Investigation of the NPs accumulation in the cells demonstrated that after 30 min of cells incubation with NPs the latter are found in the perinuclear area. It is detected that NPs do not have toxic effect on cells in a wide range of concentrations: they do not cause hemolysis, as well as the production of reactive oxygen species and the death of 4T1 cells. Investigation of the doxorubicin, loaded in NPs, delivery revealed that during the first 2 h of incubation with the cells, the accumulation of the drug is on average 2 times lower than during the cultivation with free doxorubicin. After 4 h, this difference is absent. In vivo studies have shown that after intravenous injection, NPs circulate in blood vessels for a long time. Due to the EPR effect, a gradual accumulation of NPs in the tumor occurs, which reaches a maximum 6 h after the injection. The MRI method, both in vitro and in vivo, demonstrated that the investigated NPs can be used as a contrast agent. Thus, obtained dumbbell magnetite-gold NPs do not have a toxic effect on the cells and can be used as a platform for the theranostics of malignant tumors. Moreover, they are an excellent contrast agent for MRI.

#### References:

1. Cho K. J., Wang X., Nie S. M., Chen Z., Shin D. M. *Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer* // *Clinical Cancer Research* 2008. Vol. 14. P. 1310-1316.
  2. Nan X., Zhang X., Liu Y., Zhou M., Chen X., Zhang X. *Dual-Targeted Multifunctional Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging Guided Cancer Diagnosis and Therapy* // *Acs Applied Materials & Interfaces* 2017. Vol. 9. №11. P. 9986-9995.
- The work was supported by Russian Foundation for Basic Research in the framework of the scientific project No. 18-33-01232.

УДК 615.462, 616-77

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СШИВАЮЩИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО БЫЧЬЕГО ПЕРИКАРДА С ЗАДАНЫМИ СТРУКТУРНЫМИ И БИОМЕХАНИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Гребеник (Ивукина) Е.А., Верясова Н.Н., Истранова Е.В., Истранов Л.П., Чурбанов С.Н., Шавкута Б.С., Курков А.В., Мельников П.А., Лажко А.Э., Тимашев П.С.

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Институт Регенеративной Медицины  
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2  
e-mail: zaitcevanadezhda@gmail.com

Показано, что использование сшивающих агентов различной природы для структурирования децеллюляризированной ткани бычьего перикарда приводит к изменению структурных и механических свойств.

**Ключевые слова:** децеллюляризация, перикард, сшивающие агенты, биопластические материалы.

Биопластические материалы на основе ткани перикарда млекопитающих широко используют в реконструктивной хирургии. Для снижения иммуногенности материалов ксеногенного происхождения ткань подвергают процедуре децеллюляризации, которая ведет к нежелательному снижению протеолитической устойчивости. Этот побочный эффект устраняют с помощью химического структурирования децеллюляризованных тканей перикардов. Глутаровый альдегид, традиционно используемый для этих целей, негативно влияет на биосовместимость получаемого биопластического материала, что проявляется в стимулировании цитотоксичности и увеличении жесткости. В то же время, влияние альтернативных сшивающих агентов, описанных в литературе, на свойства ксенопротезов изучено не полностью. Наш проект

посвящен изучению влияния сшивающих агентов различной природы, включая гексаметилендиизоцианат (ГМДЦ), диглицидиловый эфир этиленгликоля (ДЭЭГ), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДАК) и генипин, на механические, структурные и функциональные свойства децеллюляризованных тканей бычьих перикардов.

Для использованных сшивающих агентов определяли индекс связывания с децеллюляризованной тканью бычьего перикарда с помощью нингидриновой реакции. Структурный анализ проводили на установках сканирующего электронного (Phenom Pro X) и двухфотонного микроскопа (Nikon A1r + MP), а также при гистохимическом окрашивании образцов, в частности, красителем Picrosirius Red, и посредством определения температуры усадки. Биомеханические характеристики были определены при одноосном растяжении с помощью испытательной установки EZ-Test texture analyzer (EZSX, Shimadzu) и при измерении модуля упругости поверхности на приборе PIUMA Nanoindenter (Optics11). Уровень цитотоксичности определяли методами измерения МТТ-редуктазной и лактатдегидрогеназной активности мышинных фибробластов (ISO 10993) и морфологической оценки выживаемости клеток с использованием витальных красителей. Протеолитическую устойчивость оценивали по потере массы в результате инкубации в растворе коллагеназы при 37 °С.

По результатам структурного анализа децеллюляризованные ткани перикарда были охарактеризованы как бесклеточные губчатые структуры, состоящие из коллагеновых септ, окружающих поры. Показана общая тенденция к утолщению и структурной реорганизации коллагеновых фибрилл, а также к уменьшению анизотропии механических свойств после стабилизации матриц сшивающими агентами. Более того, под действием генипина матрицы утратили анизотропию механических свойства. Протеолитическая устойчивость заметно варьировала в зависимости от типа сшивающего агента от 6% (для ЭДАК) до 94% (для ДЭЭГ) в рамках протокола измерений. Температура усадки образцов в результате стабилизации увеличивалась в среднем на 10 °С (образец, стабилизированный ДЭЭГ показал наименьшее увеличение температуры усадки). Таким образом, использование различных приемов химической стабилизации позволяет добиться оптимизации свойств биопластических материалов и потенциально расширяет спектр их применения для тканеинженерной реконструкции.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 18-15-00401) и РФФИ (грант № 18-33-00982).

UDC 615.462, 616-77

## DEVELOPING BIOPLASTIC MATERIALS BASED ON THE DECELLULARIZED BOVINE PERICARDIUM WITH PROGRAMMED STRUCTURE AND BIOMECHANICAL PROPERTIES VIA UTILIZING CROSS-LINKING APPROACH.

**Grebenik (Ivukina) E.A., Veryasova N.N., Istranova E.V., Istranov L.P., Churbanov S.N., Shavkuta B.N., Kurkov A.V., Melnikov P.A., Lazhko A. E., Timashev P.S.**

*Sechenov University, Institute for Regenerative Medicine  
 119991, Moscow, Trubetskaya st., 8, bld. 1  
 e-mail: zaitcevanadezhda@gmail.com*

We report on the effects of chemical crosslinking of decellularized bovine pericardium tissues on structural and mechanical properties.

**Key words:** decellularization, bovine pericardium, chemical cross-linking, reconstructive surgery.

Bioplastic materials based on mammalian pericardium tissue are widely used for reconstructive surgery. Decellularization of xenogeneic pericardium tissue is able to mitigate immunogenicity but also reduce proteolytic stability. Traditionally, chemical crosslinking is employed to erase this side-effect, and the most common crosslinking agent is glutaraldehyde. However, glutaraldehyde induces cytotoxicity and increases stiffness, which negatively effect on biocompatibility of resulting bioplastic material. At the same time, the effects of existing analogues have not been completely investigated. In our project we have performed a complex study of several cross-linkers, including hexamethylenediisocyanate (HMDC), ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), and genipin in terms of the influence on structural and functional properties of decellularized bovine pericardium tissue.

Crosslinking index in decellularized pericardium tissue treated with above listed cross-linkers was evaluated using ninhydrin reaction. Structural analysis was performed using scanning electron (Phenom Pro X) and two-photon (Nikon A1r + MP) microscopes, as well as through histochemical analysis of Picrosirius Red-stained samples and shrinkage temperature evaluation. Biomechanical characteristics were measured by uniaxial tensile

tests performed with EZ-Test texture analyzer (EZSX, Shimadzu) and surface Young's Modulus probing with PIUMA Nanoindenter (Optics11). Cytotoxicity test based on MTT reduction was adopted from ISO 10993. Contact cytotoxicity evaluation was based on the live/dead staining and lactate dehydrogenase release measurements of cell-repopulated biomaterials. Collagenase stability of the samples was estimated in collagenase solution at 37 °C based on measurements of proteomass loss.

Structural analysis revealed acellular porous structures consisting of collagenous septa. Cross-linking of decellularized bovine pericardium tissue resulted in thickening and structural reorganization of collagen fibers along with reduction of mechanical anisotropy most obvious in genipin-treated samples. Proteolytic stability varied significantly (from 6% [for EDC] to 94% [for EGDE]). Shrinkage temperature increased upon cross-linking by ~ 10 degrees with the lowest impact achieved by epoxy compound treatment. To conclude, cross-linking of decellularized bovine pericardium samples is proved to tailor structural and mechanical properties aiming at personalization of material properties for specific clinical purposes.

This work was performed with support of the Russian Science Foundation under grant # 18-15-00401 and the Russian Foundation for Basic Research under grant # 18-33-00982.

УДК 62.09.39

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ IgY ЖЕЛТОЧНЫХ АНТИТЕЛ В ОТНОШЕНИИ STREPTOCOCCUS MUTANS

Плешкова О.Г., Леонов В.В., Арипов В.С., Каплин В.С., Каплина О.Н., Колосова Е.А., Щербаков Д.Н.

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия  
656049, Барнаул, пр-т Ленина, 61,  
e-mail: plolga93@mail.ru

В последние годы наблюдается рост интереса к технологиям на основе антител. Одним из направлений исследований является использование желточных антител. Это связано с тем, что птичьи антитела демонстрируют ряд преимуществ по сравнению с антителами млекопитающих. Изучено влияние куриных антител в отношении бактерий рода *Streptococcus mutans*.

**Ключевые слова:** IgY-антитела, IgY-технологии, желточные антитела, *Streptococcus mutans*.

Иммуноглобулины Y (IgY) – антитела, являющиеся основным классом антител крови птиц и рептилий. Они также встречается в высоких концентрациях в яичном желтке[1].

В ряде работ показано, что зубные пасты обогащенные IgY-антителами против *Streptococcus mutans*, обладают профилактическим и даже терапевтическим действием в отношении кариеса у детей и взрослых [2]. Этот эффект обусловлен специфическим подавлением активности бактерии *Streptococcus mutans*, грам-положительной бактерии рода стрептококков, обнаруживаемой в ротовой полости человека, и, согласно общепринятой теории играющей важную роль в разрушении ткани зубов [3].

Для наработки специфических антител проводили иммунизацию шести кур породы Леггорн рекомбинантным аналогом основного антигена *S. mutans*. После иммунизации проводили сбор яиц. Для выделения IgY был использован метод Полсона. Из 470 собранных яиц от иммунизированных кур удалось выделить около 52 г IgY. Проведенный иммуноферментный анализ показал высокий уровень антител взаимодействующих с *S. mutans*, который использовался в качестве антигена для проведения ИФА, титр специфических антител – от 1/125000 до 1/625000. Чистота препарата антител, согласно электрофоретическому анализу составила 85%.

Для анализа способности полученных специфических антител подавлять рост *S. mutans*, был использован микробиологический анализ. В работе использовали штамм *S. mutans* SS-1164. Все эксперименты были проведены с использованием сердечно-мозгового бульона и агара (HiMedia, Индия). Культуру *S. mutans* культивировали в сердечно-мозговом бульоне до оптической плотности OD=2,0 опт.ед. Далее отбирали по 100 мкл культуры и добавляли в пробирки с различными концентрациями препарата IgY антител: 0,001, 0,01, 0,1 и 1 мг/мл. Контролем служил посев в бульон, не содержащий препарат антител. Посевы выращивали в течение 5 часов при 37°C, 180 об/мин. Рост бактерий контролировали турбидиметрически на спектрофотометре MultiscanFC (ThermoScientific, США) при  $\lambda=600$  нм через 5 часов.

Полученные данные показывают, что при концентрации куриных тел от 0,001 до 0,01 мг/мл наблюдается значительное подавление роста *S. mutans* по сравнению с контрольным образцом.

Таким образом, можно сделать предположение о том, что куриные антитела подавляют рост и размно-

жение *Streptococcus mutans*, обеспечивая возможность создания профилактической зубной пасты.

Литература:

1. Арипов В.С., Каплин В.С., Каплина О.Н., Щербаков Д.Н. Получение иммуноглобулинов Y (IGY) из желтков куриных яиц против *Streptococcus mutans* // «Науки о жизни: от исследований к практике»: Материалы научного форума студентов и молодых ученых. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2017. – 83-84 с.
2. Каплин В.С., Каплина О.Н. IgY-технологии в медицине. Желточные антитела птиц в иммунотерапии // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. 2016. №4.
3. Черкес Ф.К., Богоявленская Л.Б., Бельская Н.А. Микробиология/Под ред. Ф.К. Черкес. – М.: Медицина, 1986. – 512 с., ил.

УДК 62.09.39

## THE RESEARCH OF THE IGY YOLK ANTIBODIES ACTIVITY REFERRING TO STREPTOCOCCUS MUTANS

Pleshkova O.G., Leonov V.V., Aripov V.S., Kaplin V.S., Kaplina O.N., Kolosova E.A., Sherbakov D.N.

Altai state university, Barnaul, Russian  
656049, Barnaul, prospect Lenina 61,  
e-mail: plolga93@mail.ru

There is an interest increase to the technologies based on antibodies recently. One of the research directions is yolk antibodies usage. It's related to the bird's antibodies that demonstrate series of advantages comparing to mammalian antibodies. The chicken's antibodies influence to the *Streptococcus mutans* bacteria has been explored.

**Key words:** IgY-antibodies, IgY-technologies, yolk antibodies, *Streptococcus mutans*

Immunoglobulins Y (IgY) are antibodies which are main class of bird's and reptile blood antibodies. They are also contained in egg yolk in high concentration [1].

It's shown in series of works that toothpaste which is enriched with IgY-antibodies against *Streptococcus mutans* have prophylactic and even therapeutically effect to the child and adult caries [2]. This effect is conditioned by the specific suppression of *Streptococcus mutans* bacteria activity, gram-positive bacteria of *Streptococcus* genus, which can be detected in human oral cavity and, according to common theory, play the important role in tooth tissue distruction process [3].

For earning specific antibodies there had been provided the immunization of six Leghorn breed chickens with *S. mutans* antibodies recombinative analogue. After the immunization the egg collection has been provided. To extract IgY the Paulson method was used. From 470 eggs which were collected from the immunized chickens about 52g of IgY were received. The immunopherment analysis carried has shown high level of antibodies which cooperate with *S. mutans*, which was used as antigen for makin immunopherment analysis, speccific antibodies titer was from 1/125000 to 1/625000. Antibodies preparation cleanliness according to electrophoretic analysis made 85 %.

To analyze the ability of specific antibodies to suppress the *S. mutans* growing, microbiological analysis was used. In this work the *S. mutans* strain SS-1164 was used. All experiments were conducted with the use of brain-heart infusion and agar (HiMedia, India). *S. mutans* croop was cultivated in brain-heart infuson to the OD=2.0 optical density. Further the crop was divided into the amount of 100 mcl and it was added to the test-tubes with different concentration of antibodies IgY preparation: 0.001, 0.01, 0.1 and 1 milligram or milliliter. The crop to the infuson which doesn't contain antibodies preparation was a control. The crops were cultivated during 5 hours at 37°C, 180 turns per hour. Bacteria growing was controlled turbidimetrically on MultiscanFC spectrophotometer (ThermoScientific, USA) at lambda as 600 nanometers after 5 hours.

Data received show that at chicken bodies concentration from 0.001 to 0.01 milligram or milliliter there is a significant *S. mutans* growth suppression comparing to control sample.

Thus we can guess that chicken antibodies suppress *Streptococcus mutans* growth and production and so can provide the opportunity to making prophylactical toothpaste.

Refeences:

1. Aripov V.S., Kaplin V.S., Kaplina O.N., Sherbakov D.N. Obtaining immunoglobulins Y (IGY) from yolks of chicken eggs against *Streptococcus mutans* // "Life Sciences: From Research to Practice": Proceedings of the Scientific Forum of Students and Young Scientists. - Barnaul: Publishing house Alt. Univ., 2017. - 83-84 p.

2. Kaplin V.S., Kaplina O.N. *IgY-technologies in medicine. Vitelline antibodies of birds in immunotherapy // International reviews: clinical practice and health. 2016. №4.*

3. Cherkess F.K., Bogoyavlenskaya L.B., Belskaya N.A. *Microbiology / Ed. F.K. Circassian. - Moscow: Medicine, 1986. - 512 p., Ill.*

УДК 57.089.24

## ИССЛЕДОВАНИЕ ОСАЖДЕНИЯ ЗАРЯЖЕННОГО НАНОАЭРОЗОЛЯ В ФИЗИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ЛЕГКОГО

Канев И. Л., Морозов В. Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, г. Пущино Московской обл., Россия, ул. Институтская, 3  
e-mail: 4kanev@gmail.com

С использованием модели легкого животного показано, что электрически заряженные наночастицы аэрозоля осаждаются в легких существенно более эффективно по сравнению с нейтральными.

**Ключевые слова:** наноаэрозоль, заряженный аэрозоль, модель легкого, наночастицы.

Осаждение наночастиц в легких человека и животных представляет интерес для исследований, касающихся биологических эффектов загрязнения воздуха, а также для разработки новых ингаляционных способов доставки лекарств в легкие. Как природные, так и искусственно получаемые аэрозоли часто заряжены, что оказывает влияние на степень осаждения и распределение аэрозоля внутри легких.

Метод электрораспыления с нейтрализацией в газовой фазе позволяет получать частично заряженные наноаэрозоли, размер частиц которых позволяет им проникать в глубокие отделы легких. В данной работе был использован генератор наноаэрозолей, описанный ранее в работе [1]. Модель легкого была изготовлена из сухого легкого свиньи. Сухие легкие были разделены на две доли, и электропроводящая трубка для введения аэрозоля была соединена с входом бронха. Внешний слой доли легкого толщиной 1-2 мм был удален для открытия альвеол. Вероятность осаждения аэрозоля рассчитывалась из сравнения распределения размеров наночастиц, прошедших через легкое, с контролем. Было продемонстрировано, что осаждение нейтральных аэрозольных частиц хорошо согласуется с прогнозом модели многофакторной дозиметрии частиц (MPPD). С использованием новой модели легкого показано, что электрически заряженные наночастицы с размером 100 нм, несущие несколько элементарных зарядов, осаждаются в легких существенно более эффективно по сравнению с нейтральными [2]. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-15-00086.

Литература:

1. Morozov VN, Kanev IL, Mikheev AY, Shlyapnikova EA, Shlyapnikov YM, Nikitin MP, Nikitin PI, Nwabueze AO, van Hoek ML. *Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances. J. Aerosol Sci. 2014 Vol. 69 P. 48–61*

2. V.N. Morozov, I. L. Kanev *Dry Lung as a Physical Model in Studies of Aerosol Deposition. Lung 2015 Vol. 193 P. 799–804.*

UDC 57.089.24

## CHARGED NANOAEROSOL DEPOSITION STUDIED IN A PHYSICAL LUNG MODEL

Kanev I. L., Morozov V. N.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS  
e-mail: 4kanev@gmail.com

Using an animal lung model we demonstrated that electrically charged aerosol nanoparticles are deposited inside the lung substantially more efficiently than neutral ones.

**Key words:** nanoaerosol, charged aerosol, lung model, nanoparticles.



Deposition of nanoparticles in human and animal lungs is of interest in studies of the biological effects of air pollution and in development of new inhalation techniques for pulmonary drug delivery. Both natural and generated aerosols are often charged and the charges influence the extent of aerosol deposition and its regional distribution within the lungs.

The method of electrospraying with neutralization in the gas phase makes it possible to obtain partially charged nanoaerosols, the size of which enables their penetration into deep regions of the lungs. The nanoaerosol generator used in these experiments has been described in our recent publication [1]. The lung model was manufactured from commercial dry swine lungs. The dry lungs were cut into two lobes and a conductive rubber tube was glued into the bronchial tube. The upper 1–2-mm-thick layer of the lung lobe was removed to expose the alveoli. The probability of aerosol deposition within the lung model was calculated by comparing the size distribution of nanoparticles passed through the lung with that of control. It was demonstrated that deposition of neutral aerosol particles well fits prediction of the Multiple-Path Particle Dosimetry (MPPD) model. Using this new lung model, it was demonstrated that electrically charged nanoparticles 100 nm in size, carrying several elementary charges, are deposited inside the lung substantially more efficiently than the neutral nanoparticles [2]. The authors acknowledge funding from the Russian Science Foundation, (Grant # 15-15-00086).

#### References:

1. Morozov VN, Kanev IL, Mikheev AY, Shlyapnikova EA, Shlyapnikov YM, Nikitin MP, Nikitin PI, Nwabueze AO, van Hoek ML. Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances. *J. Aerosol Sci.* 2014 Vol. 69 P. 48–61
2. V.N. Morozov, I. L. Kanev Dry Lung as a Physical Model in Studies of Aerosol Deposition. *Lung* 2015 Vol. 193 P. 799–804.

УДК 620.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ БЛОКИРОВКИ СИСТЕМЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ФАГОЦИТОВ

Миркасымов А.Б.<sup>1,2</sup>, Зелепукин И.В.<sup>1,2</sup>, Никитин М.П.<sup>1,2,3</sup>, Никитин П.И.<sup>3</sup>, Деев С.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16\10, mirkasymov@phystech.edu

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

<sup>3</sup> Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

Используя блокировку системы мононуклеарных фагоцитов, существенно продлили время циркуляции наночастиц в кровотоке. Блокировка была достигнута после поглощения высоких доз наночастиц. Исследовали зависимость эффективности метода от размера частиц-блокатора и их покрытия.

**Ключевые слова:** наночастицы, фармакокинетика, блокировка макрофагов, система мононуклеарных фагоцитов.

Наночастицы (НЧ), вследствие своих уникальных свойств, являются перспективными агентами для использования в медицине в качестве переносчиков лекарственных средств, диагностики и т.д. Однако при попадании частиц в системный кровоток они быстро поглощаются макрофагами системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), что сильно ограничивает эффективность терапии. В данной работе для продления циркуляции частиц в кровотоке применен метод блокировки СМФ, заключающийся во введении высокой дозы нетоксичных НЧ, которые, поглощаясь макрофагами, замедляют фагоцитоз следом введенных токсичных НЧ. Было исследовано влияние основных физико-химических параметров частиц-блокаторов (размер и покрытие) на эффективность блокировки СМФ.

Для решения поставленной задачи мы синтезировали набор кремниевых частиц различного диаметра, используя реакцию гидролиза тетраэтоксисилана. Также для блокировки макрофагов использовались магнитные наночастицы с различными полимерными покрытиями.

Неинвазивная детекция количества НЧ в реальном времени проводилась на основе их нелинейного намагничивания в ответ на прикладываемое переменное магнитное поле, генерируемое на двух частотах (MPQ-детекция) [1].

Нами было показано, что блокировка СМФ позволяет значительно продлить циркуляцию НЧ в кровотоке. Эффективность метода главным образом обусловлена материалом покрытия частиц, но также растет с размером блокатора.

Использование метода с учетом изученных параметров позволит эффективно применять НЧ in vivo.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 17-74-20146)

Литература:

1 - Nikitin M. P. et al. Quantitative real-time in vivo detection of magnetic nanoparticles by their nonlinear magnetization // *Journal of applied Physics*. – 2008. – T. 103. – №. 7. – С. 07A304-1 – 07A304-3.

.UDC 620.3

## INVESTIGATION OF PARAMETERS INFLUENCING THE EFFICIENCY OF THE MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM BLOCKADE

Mirkasymov A.B.1,2, Zelepukin I.V.1,2, Nikitin M.P.1,2,3, Nikitin P.I.3, Deyev S.M.1

1Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

117997, Moscow, Mikluho-Maklaya, 16\10, mirkasymov@phystech.edu

2Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

3Prokhorov General Physics Institute RAS, Moscow, Russia

Nanoparticles circulation time in the bloodstream was significantly prolonged using mononuclear phagocyte system blockade. Macrophage blockade was caused by the uptake of the high dose of blocking particles. We investigated influence of the particles properties, for example, its size and surface coating, on the method efficiency.

**Key words:** nanoparticles, pharmacokinetics, macrophage blockade, mononuclear phagocyte system.

Nanoparticles (NPs), due to their unique properties, are promising agents for drug delivery, diagnostic and other applications. However, after particles administration they are quickly eliminated by macrophages of the mononuclear phagocyte system (MPS). This fact greatly limits the effectiveness of the nanosized drugs.

Here, we caused MPS blockade by the uptake of the high dose of nontoxic blocking NPs. Inhibition of the cell phagocytosis activity lead to significant prolongation of secondly administered dose of tracing nanoparticles. We investigated influence of the blocking particles size and surface coating on the effectiveness of the MPS blockade.

For this aim, we synthesized a library of silica particles of various diameters in the 100-1000 nm range, using the reaction of tetraethoxysilane hydrolysis. Also, for MPS blockade we used blocking magnetic particles with various polymeric coatings.

Real time noninvasive magnetic NP quantity detection was carried out based on their nonlinear magnetization in response to an applied alternating magnetic field generated at two frequencies (MPQ-technique) [1].

We showed that the MPS blockade significantly prolong nanoparticles blood circulation time. The effectiveness of this method depends mainly on the particles surface coating, but also increases with growing NPs size.

The method of macrophage blockade in combination with the obtained results can be applied for enhancing the efficiency of theranostic nanoparticles in vivo.

The work was supported by the Russian Science Foundation (grant № 17-74-20146)

References:

1 - Nikitin M.P., Torno M., Chen H., Rosengart A., Nikitin P.I. Quantitative real-time in vivo detection of magnetic nanoparticles by their nonlinear magnetization // *Journal of applied Physics*. 2008. 103(7), p. 07A304-1 – 07A304-3.

УДК 606:628.161

## КОМПОЗИТНЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ СОДЕРЖАЩИХ ХИТОЗАН КРИОГЕЛЕЙ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА ДЛЯ ДООЧИСТКИ СТОЧНЫХ И ПИТЬЕВЫХ ВОД

Ульябаева Г.Р.<sup>1</sup>, Подорожко Е.А.<sup>2</sup>, Губочкина А.А.<sup>1</sup>, Кильдеева Н.Р.<sup>2</sup>, Лозинский В.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский государственный университет им. А.Н.Косыгина, Москва, Россия, 117997, Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр.1

<sup>2</sup> Институт элементоорганических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук, Москва, Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, д.28  
 e-mail: gulnaz\_ulyabaeva@mail.ru

Процессы реабилитации природных вод предусматривают извлечение и концентрирование загрязнений из растворов сложного химического состава. Наличие в хитозане функционально-активных аминогрупп открывает возможности его использования в качестве сорбента для ряда загрязнителей органической и неорганической природы. В работе исследованы перспективы использования хитозан-содержащих криогелей поливинилового спирта для доочистки сточных вод от ионов тяжелых металлов и текстильных красителей. Установлена высокая сорбционная способность таких композитных криогелей по отношению к ионам меди и кислотным красителям.

**Ключевые слова:** криогели; ПВС; хитозан; сорбенты; доочистка сточных вод; многократное использование.

Криогели поливинилового спирта (ПВС) – широкопористые гелевые матрицы, формируемые криогенной обработкой (замораживание – выдерживание в замороженном состоянии – оттаивание) концентрированных растворов данного полимера. Известно, что одним из способов улучшения эксплуатационных свойств полимерных материалов является введение в систему различных модификаторов и наполнителей. Так, например, смешение двух полимеров позволяет сочетать в конечном продукте свойства обоих компонентов. Благодаря наличию аминогрупп, хитозан является специфическим сорбентом для ионов тяжелых металлов, лекарственных соединений и красителей. Крупнопористая структура и развитая поверхность криогелей поливинилового спирта с добавками хитозана открывают перспективы создания сорбентов с заданными транспортными свойствами, систем с контролируемым выделением лекарственных соединений и др. Кроме того, использование растворимых в воде компонентов смеси упрощает технологию получения криогелей и их дальнейшую обработку.

Ранее нами были установлены закономерности формирования криогелей из смешанных растворов ПВС и хитозана в области отрицательных температур, а также изучены морфология и свойства образующихся гелевых материалов [1,2]. Были получены и исследованы комплексные и композитные криогели на основе водных растворов смесей ПВС и хоргидрата хитозана (ХГХ). Последующая щелочная обработка приводила к превращению водорастворимого ХГХ в нерастворимую форму хитозана-основания (ХТО), включенного как дисперсный наполнитель в непрерывную фазу макропористого криогеля ПВС.

Изучение сорбционных свойств композитных криогелей по отношению к ионам меди-II показало, что криогели ПВС-ХТО обладают высокой сорбционной активностью и скоростью достижения сорбционного равновесия. Значение предельной абсорбции  $A_{\infty}$  составило 5,3 – 5,6 ммоль  $Cu^{2+}/г$  хитозана, тогда как предельная сорбционная емкость порошкового хитозана достигала лишь 3,6 ммоль  $Cu^{2+}/г$ . Процесс извлечения красителей из водных растворов криогелями ПВС-ХТО был исследован на примере кислотных красителей, содержащих разные типы функциональных групп. Показано, что предельная сорбционная емкость композитов ПВС-ХТО в отношении кислотных красителей составила 30-50 мг/г хитозана. Содержание сорбированного красителя на криогеле существенно превышало соответствующий показатель (6-10 мг/г волокна), полученный при крашении шерсти в оптимальных условиях.

Литература:

1. Подорожко Е.А., Ульябаева Г.Р., Кильдеева Н.Р., Тихонов В.Е., Антонов Ю.А., Журавлева И.Л., Лозинский В.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 41. Комплексные и композитные криогели поливинилового спирта, содержащие соответственно, растворимую и нерастворимую формы хитозана. // Колл.ж. 2016. Т. 78. № 1. - С. 75–87.
2. Подорожко Е.А., Ульябаева Г.Р., Тихонов В.Е., Грачев А.В., Владимиров Л.В., Антонов Ю.А., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. Изучение криоструктурирования полимерных систем. 43. Особенности микроструктуры хитозан-содержащих комплексных и композитных криогелей поливинилового спирта. // Колл.ж. 2016. Т. 78. № 6. – С. 760–771

3. Ульябаева Г.Р., Подорожко Е.А., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И. Особенности микроструктуры и свойств криогелей поливинилового спирта, содержащих добавки различных форм хитозана. //Каргинская конференция "Полимеры-2017" Сборник тезисов, Москва, Россия 13-17 июня. 2017. – С. 748  
Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках базовой части госзадания в сфере научной деятельности проект № 10.7554.2017/БЧ.

УДК606.628.161

## COMPOSITE SORBENTS BASED ON THE CHITOSAN-CONTAINING CRYOGELS OF POLYVINYL ALCOHOL FOR THE FINISHING PURIFICATION OF WASTE AND DRINKING WATERS

Ul'yabaeva G.R. <sup>1</sup>, Podorozhko E.A. <sup>2</sup>, Gubochkina A.A. <sup>1</sup>, Kildeeva N.R. <sup>1</sup>, Lozinsky V.I. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> A.N.Kosygin Russian State University (Technologies, Design, Art), Moscow, Russia, 117997, Moscow, ul.Sadovnicheskaya, 33, building 1

<sup>2</sup> A.N.Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Vavilov St. 28.

e-mail: gulnaz\_ulyabaeva@mail.ru

The processes of natural waters remediation imply the extraction and concentrating of the contaminants from the solutions of complex chemical composition. The presence in the chitosan of functionally active amino groups opens the possibility for its use as a sorbent for a number of pollutants of both organic and inorganic nature. In this study the prospects of the chitosan-containing cryogels implementation for the finishing refining of wastewater from the heavy metal ions and textile dyes have been investigated. High sorption ability of such composite cryogels with respect to copper ions and acidic dyes has been established.

**Key words:** cryogels; PVA; chitosan; sorbents; finishing refining of waste water; repeated use.

Cryogels of poly(vinyl alcohol) (PVA) are the wide-porous gel matrices formed by the cryogenic treatment (freezing – holding in a frozen state – thawing) of concentrated solutions of the polymer. It is known that one of the ways to improve the operational properties of polymeric materials is the introduction of various modifiers and fillers into the system. Thus, for example, the mixing of two polymers makes it possible to combine the properties of both components in the final product. Due to the presence of amino groups, chitosan is a specific sorbent for the heavy metal ions, drug compounds and dyes. While the wide-pore structure and developed surface of PVA cryogels that also contain chitosan additives, open prospects for the creation of sorbents with predetermined transport properties, controlled drug release systems, and so forth. Besides, the use of water-soluble components of the mixture simplifies the technology of obtaining cryogels and their further processing.

Previously, the regularities of the formation of cryogels from mixed solutions of PVA and chitosan in the negative temperature region have been established, as well as the morphology and properties of the resultant gel materials have been studied [1, 2]. Complex and composite cryogels based on the aqueous solutions of PVA + chitosan chlorohydrate (CTC) mixtures have been prepared and explored. Subsequent alkaline treatment resulted in the transformation of water-soluble CHC to the insoluble form of the chitosan-base (CTB) incorporated as a dispersed filler inside the continuous phase of macroporous PVA cryogel.

The study of the sorption properties of composite cryogels with respect of copper-II ions showed that PVA-CTB-cryogels possess high sorption activity and the rate of sorption equilibrium reaching. The value of the ultimate absorption  $A_{\infty}$  was 5.3-5.6 mmol Cu<sup>2+</sup> per 1 g of chitosan, while the maximum sorption capacity of the chitosan powder reached only 3.6 mmol Cu<sup>2+</sup>/g. The process of dye extraction by PVA-CTB-cryogels from the aqueous solutions was examined regarding the acidic dyes containing different types of functional groups. It was shown that the ultimate sorption capacity of the PVA-CTO-composites was about 30-50 mg per 1 g of chitosan. The content of the dye on the cryogel-type sorbent exceeded significantly the corresponding index (6-10 mg/g) found upon dyeing the wool fibers under optimal conditions.

### References:

1. E. A. Podorozhko, G. R. Ul'yabaeva, N. R. Kil'deeva, V. E. Tikhonov, Yu. A. Antonov. A Study of Cryostructuring of Polymer Systems. 41. Complex and Composite Poly(vinyl alcohol) Cryogels Containing Soluble and Insoluble Forms of Chitosan, Respectively.//Colloid Journal, 2016, Vol. 78, No. 1, pp. 90–101
2. E. A. Podorozhko, G. R. Ul'yabaeva, V. E. Tikhonov, A. V. Grachev, L. V. Vladimirov, Yu. A. Antonov, N. R. Kil'deeva, and V. I. Lozinsky. A Study of Cryostructuring of Polymer Systems. 43. Characteristics of Microstructure of Chitosan-

*Containing Complex and Composite Poly(vinyl alcohol) Cryogels. // Colloid Journal, 2017, Vol. 79, No. 1, pp. 94–105*  
 3. G. R. Ul'yabaeva, E. A. Podorozhko, N. R. Kil'deeva, V. I. Lozinsky. Features of microstructure and properties of cryogels of polyvinyl alcohol, containing additives of various forms of chitosan. // Kargin'skaya conference "Polymers-2017" Abstracts collection, Moscow, Russia June 13-17. 2017. - P. 748

УДК 615.46

## **КРИТИЧЕСКИЙ ВЗГЛЯД НА ЭВОЛЮЦИЮ МАТЕРИАЛОВ И БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНО-ХРЯЩЕВЫХ ДЕФЕКТОВ**

**Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Каралкин П.А.**

*Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Москва, Россия, 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., д.3,  
 e-mail: prognoz.06@mail.ru*

В сообщении будут представлены как результаты собственных исследований, так и обзор современных трендов в реконструкции костно-хрящевых дефектов.

**Ключевые слова:** биоматериалы для остеопластики, костно-хрящевые дефекты, тканеинженерные конструкции, скорость биорезорбции

Использование кальций-фосфатных материалов разного химического и фазового состава для заполнения костных дефектов исторически лежит в основе этого направления медицинского материаловедения и обосновано близостью состава кальций-фосфатной керамики к минеральному компоненту костной ткани. Основной биологической проблемой данного класса биоматериалов является низкая скорость их биорезорбции. Это потребовало разработки технологий создания пористых материалов. Одним из наиболее распространенных подходов является выжигание органических компонентов из неорганических скаффолдов. Однако эта техника не позволяет создать материалы с взаимосвязанными порами нужных размеров и геометрии. Способы протравливания поверхности кальций-фосфатных материалов, получаемых из нанопорошков как по керамической, так и по цементной технологиям, привели к получению имплантатов с развитой шероховатой поверхностью и, как следствие, с высокой адгезивностью для клеток и сорбционной емкостью для белков и биологически активных веществ. Таким образом, была сформирована платформа для создания функционально-ориентированных биоинженерных конструкций, содержащих, кроме неорганической составляющей, клетки, лекарства, факторы роста и другие биологически активные вещества.

Применение 3D-принтинга для изготовления костных имплантатов с учетом знаний о составе костной ткани как полимер-неорганическом композите закономерно привело к использованию наряду с кальций-фосфатным компонентом и резорбируемой органической составляющей. В этом аспекте был апробирован целый спектр белковых и углеводных полимеров (природного или синтетического происхождения): гидрогели на основе коллагена, альгината натрия, желатина, производные гиалуроновой кислоты, полилактиды, полилактогликолиды, хитозаны и др.

Технология 3D-принтинга в настоящее время позволяет получать скаффолды и тканеинженерные конструкции сложной геометрии, с развитой поверхностью, взаимосвязанной пористостью и заданной скоростью биорезорбции. В то же время, используемые сегодня в 3D-принтинге органические компоненты хотя и подвергаются резорбции, однако в процессе биоутилизации не способствуют остеогенезу, что зачастую приводит к формированию на их месте не костной, а собственно соединительной ткани. Таким образом, поиск новых составов органических компонентов, обеспечивающих адекватный сценарий ремоделирования 3D-композиционных имплантатов и тканеинженерных конструкций в области костного дефекта, остается актуальной задачей.

UDC 615.46

## CRITICAL VIEW ON THE EVOLUTION OF MATERIALS AND BIORESORBABLE TISSUE ENGINEERING CONSTRUCTS FOR SUBSTITUTION OF BONE AND CARTILAGE DEFECTS

Sergeeva N.S., Sviridova I.K., Karalkin P.A.

*P.A. Herzen Moscow Research Oncological Institute, branch of National Medical Research Centre of Radiology, the Ministry of Health of the Russian Federation  
3, 2nd Botkinsky pass., 125284, Moscow, Russia  
e-mail: prognoz.06@mail.ru*

In this report, the results of our own studies as well as review of modern trends of bone and cartilage defects reconstruction will be presented.

**Key words:** osteoplastic biomaterials, bone and cartilage defects, tissue engineering constructs, rate of bioresorption.

The use of calcium-phosphate materials of different chemical and phase composition in order to fill bone defects historically underlies this direction of medical materials science and is justified by the similarity of calcium-phosphate ceramic composition to the mineral component of bone tissue. The main biological problem of such biomaterials is the low rate of their bioresorption. So, it is required the development of technologies for the creation of porous materials. One of the most common approaches is the burning of organic components from inorganic scaffolds. However, this technique does not allow the creation of materials with interconnected pores of the right size and geometry. Methods for etching of nanopowders-obtained calcium phosphate materials surface is suitable both in ceramic and in cement technology and led to the production of implants with a developed rough surface, well adhesiveness for cells and high sorption capacity for proteins and biologically active substances. Thus, the platform for creation of functionalized bioengineering structures that contain, in addition to the inorganic component, cells, drugs, growth factors and other biologically active substances, was shown.

The use of 3D printing for the production of bone implants, taking into account knowledge of the composition of bone tissue as a polymer-inorganic composite, led to use resorbable organic polymers in addition to calcium-phosphate component. In this aspect, a whole range of protein and carbohydrate polymers (natural or synthetic origin) was tested: hydrogels based on collagen, sodium alginate, gelatin, hyaluronic acid derivatives, polylactides, polydactoglycolides, chitosans, etc.

The technology of 3D printing now allows design and manufacturing of scaffolds with complex geometry, developed surface, interrelated porosity and a predetermined rate of bioresorption. At the same time, despite the evidence of resorption in vivo, current organic components for 3D printing do not contribute to osteogenesis itself during bioutilization, that often leads to the formation of bone tissue rather than bone tissue in their place. Thus, the search for new compositions of organic components that provide an adequate scenario for remodeling 3D composite implants in the area of bone defects is still an important issue.

УДК: 544.774.3, ББК: 24.6

## ЛИПИДОПОДОБНЫЕ МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ МИРНК

В.И.Уварова

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские Горы, 1, uvarova\_viktoriya@bk.ru, 89197642524*

Терапия, основанная на целенаправленном подавлении экспрессии генов с использованием малой интерферирующей РНК (миРНК), является в настоящее время одной из наиболее перспективных областей исследований из-за возможности использования достаточно малых концентраций для достижения терапевтического эффекта. Однако, низкая стабильность в физиологических условиях, а также сложность целевой доставки, являются серьезными препятствиями для их широкого клинического применения. Интернализация систем доставки миРНК на основе липидов внутрь клетки обычно происходит через эндоцитоз, соответственно, релевантными являются системы доставки, которые могут облегчить эндосомальный побег. В этом исследовании мы разработали липидоподобные наночастицы магнетита (ЛНЧ) для магнит-

ного иницирования внутриклеточной доставки малых интерферирующих РНК (миРНК).

**Ключевые слова:** Адресная доставка лекарств, миРНК, терапия гиперлипидемии, малые интерферирующие РНК

Терапевтическая миРНК является перспективной технологией, которая основана на деградации гена транскрипции мРНК белка, например, продуцируемого в печени аполипопротеина В (АpoВ), повышенный уровень которого коррелирует с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Молекулы миРНК отрицательно заряжены и, как правило, не могут проходить через клеточную мембрану путем свободной диффузии [1]. Одним из подходов для повышения эффективности проникновения миРНК в клетку является эндоцитоз нуклеиновых кислот, включенных в невирусные векторы, такие как липосомы, наночастицы и конъюгаты с катионными полимерами, липидами [2]. Среди множества исследованных синтетических генных переносчиков оксида железа является одним из наиболее привлекательных материалов для доставки лекарственных средств ввиду биосовместимости, магнитных свойств, которые могут обеспечивать целенаправленную доставку в цитоплазму и повышать эффективность трансфекции путем применения переменного магнитного поля (магнетофекция). Магнетофекция представляет собой метод доставки генов, в котором функционализированные суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, связанные с нуклеиновыми кислотами, используются и направляются внешним магнитным полем в целевые клетки, чтобы облегчить прохождение нуклеиновых кислот через мембрану и / или добиться механического разрушения эндосом и высвобождение миРНК в цитоплазму. Гидродинамический размер, поверхностный заряд и компоненты покрытия наночастиц регулируют их фармакокинетику и биораспределение. Покрытие наночастиц магнетита липидными молекулами осуществлялось методом замены растворителя [3]. Был исследован клеточный захват липидоподобных (формуляция, состоящая из C12-200 [4], DSPE, холестерина и различных модификаций ПЭГ-липидов) наночастиц магнетита с загруженной миРНК АpoВ. Чтобы избежать неспецифических взаимодействий с кровью и внеклеточными элементами, использовали несколько типов ПЭГ-липидов, таких как полиэтиленгликоль-2000 и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N- [амино (полиэтиленгликоль) -2000], в качестве гидратированного стерического барьера, окружающего носитель.

Было показано, что ЛНЧ интернализуется в клетках (HepG2, Huh7) после 20-30 минут инкубации посредством рецепторно-опосредованного эндоцитоза. Биологическое распределение различных типов ЛНЧ (кубов, сфер) *in vivo* показало значительный уровень накопления в печени, который наблюдался уже через 1 час после инъекции и поддерживался в течение 48 часов (MPT). Гистологическое окрашивание по Перлсу, которые применяется для обнаружения и идентификации трехвалентного железа в ткани, использовалось для определения локализации наночастиц в печени *ex vivo*. Кубические наночастицы с магнитным ядром оксида железа в диапазоне от 10 до 20 нм и гидродинамическим размером менее 100 нм достигли более высоких уровней накопления в гепатоцитах (более 90%), тогда как более крупные наночастицы аккумулировались в клетках Купфера и других компонентах ретикулоэндотелиальной системы (РЭС). После этого наночастицы магнетита метаболизируются в растворимую и не суперпарамагнитную форму железа, которая вводится в обычный пул железа (например, ферритин, гемосидерин, гемоглобин) в течение пары дней [5].

Было показано, что ЛНЧ достигают высоких уровней накопления в гепатоцитах (более 90%) *in vivo* и через 20-30 минут инкубации интернализируются в клетках с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза *ex vivo*. Соответственно, ЛНЧ демонстрируют высокий потенциал в качестве перспективной платформы для доставки миРНК в печень.

#### Литература:

1. Lu J.J., Langer R., Chen J. A Novel Mechanism Is Involved in Cationic Lipid-Mediated Functional siRNA Delivery // *Mol. Pharm.* 2009. Vol. 6, № 3. P. 763–771.
2. Schroeder A. et al. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery: Symposium: Lipid-based siRNA nanotherapeutics // *J. Intern. Med.* 2010. Vol. 267, № 1. P. 9–21.
3. Jiang S. et al. Lipidoid-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Efficient DNA and siRNA delivery // *Nano Lett.* 2013. Vol. 13, № 3. P. 1059–1064.
4. Love K.T. et al. Lipid-like materials for low-dose, *in vivo* gene silencing // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 5. P. 1864–1869.
5. Busquets M.A., Estelrich J., Sánchez-Martín M.J. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents // *Int. J. Nanomedicine.* 2015. P. 1727.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке соглашения №14.578.21.0201 (Уникальный идентификатор RFMEFI57816X0201)

UDC 544.774.3, BBC 24.6

## TARGETED SIRNA DELIVERY BASED ON LIPIDOID-COATED MAGNETIC NANOPARTICLES

V.Uvarova

Lomonosov Moscow State University, Russia, 119234, Moscow, Leninskie gory, 1

Therapy based on purposeful suppression of gene expression by using small interfering RNA (siRNA) is currently one of the most promising field of research due to possibility of using sufficiently low concentrations to achieve a therapeutic effect. However, insufficient stability in physiological conditions, as well as the complexity of targeted delivery are significant barriers to their broad clinical application. Internalization of lipid-based siRNA delivery systems into cells typically occurs through endocytosis, accordingly, relevant are delivery systems that can facilitate endosomal escape. In this study, we developed lipidoid-coated magnetite nanoparticles (LNP) to magnetically trigger intracellular delivery of small interfering RNA (siRNA).

**Key words:** Targeted drug delivery, siRNA, hyperlipidemia treatment, small interfering RNA

Therapeutic siRNA is a promising technology based on mRNA transcripts gene degradation for decreasing of protein synthesis level, for example apolipoprotein B (ApoB), produced in liver, which correlates with several cardiovascular diseases. siRNAs are negatively charged and typically cannot pass through the cell membrane by free diffusion [1]. One approach to facilitate siRNA uptake is the endocytosis of the nucleic acid encapsulated within non-viral vectors, such as liposomes, nanoparticles and conjugates with cationic polymers, lipids [2]. Among the many examined synthetic gene carriers of iron oxide is one of the most attractive materials for the drug delivery due to biocompatibility, magnetic properties that provides targeted delivery into the cytoplasm and might increase transfection efficiency by applying an alternating magnetic field (magnetofection). Magnetofection is gene delivery method, where functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles coupled with nucleic acids are used and guided by an external magnetic field to the targeted cells, in order to facilitate the passage of nucleic acids through the membrane and / or achieve mechanical destruction of endosomes and the release of siRNA into the cytoplasm. The hydrodynamic size, surface charge and coating substance of the nanoparticles governs their pharmacokinetics and biodistribution. Magnetite nanoparticles were coated with used the solvent replacement method [3]. Lipid-coated (C12-200 [4], DSPE, cholesterol and different modifications of PEG lipids) magnetite nanoparticles with loaded siRNA ApoB were investigated for cell uptake. To avoid nonspecific interactions with blood and extracellular elements, several types of PEG lipids such as polyethylene glycol-2000 and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] were used as the hydrated steric barrier surrounding the carrier.

It was shown that LNP internalize into cells (HepG2, Huh7) after 20-30 minutes of incubation by clathrin-mediated endocytosis. Biological distribution of various types of LNP (cubes, spheres) in vivo shows significant level of accumulation in the liver which was observed already 1 h after the injection, and maintained for 48 h (MRI). Histological staining Perls' Prussian Blue sections which apply to detect and identify ferric iron in tissue were used to determine the localization of nanoparticles in the liver ex vivo. Cubic nanoparticles in the with iron oxide core in range of 10 to 20 nm and hydrodynamical size less than 100 nm reach higher levels of accumulation in hepatocytes (more than 90 %), whereas larger particles were absorbed by Kupffer cells or other components of the reticuloendothelial system (RES). After that, magnetite nanoparticles are metabolized into a soluble and non superparamagnetic form of iron, which is incorporated into the normal iron pool (eg, ferritin, hemosiderin, hemoglobin) within a couple of days [5].

It was shown that LNP reaches high levels of accumulation in hepatocytes (more than 90%) in vivo and after 20-30 minutes of incubation internalize into cells by clathrin-mediated endocytosis ex vivo. Accordingly, LNP show promising potential as a platform for siRNA delivery to the liver.

### References:

1. Lu J.J., Langer R., Chen J. A Novel Mechanism Is Involved in Cationic Lipid-Mediated Functional siRNA Delivery // *Mol. Pharm.* 2009. Vol. 6, № 3. P. 763–771.
2. Schroeder A. et al. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery: Symposium: Lipid-based siRNA nanotherapeutics // *J. Intern. Med.* 2010. Vol. 267, № 1. P. 9–21.
3. Jiang S. et al. Lipidoid-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Efficient DNA and siRNA delivery // *Nano Lett.* 2013. Vol. 13, № 3. P. 1059–1064.
4. Love K.T. et al. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 5. P. 1864–1869.
5. Busquets M.A., Estelrich J., Sánchez-Martín M.J. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents // *Int. J. Nanomedicine.* 2015. P. 1727.

**Grant:** The work was supported by the Ministry of Educat



УДК 577.15.

## МАГНИТНЫЕ ЛИПОСОМЫ С АГРЕГАТАМИ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИСЛОЕ ДЛЯ УПРАВЛЯЕМОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЛЕКАРСТВ

Петрунин А.В.<sup>1</sup>, Власова К.Ю.<sup>1</sup>, Ле-Дейген И.М.<sup>1</sup>, Жигачёв А.О.<sup>2</sup>, Прусов А.Н.<sup>1</sup>, Головин Ю.И.<sup>1,2</sup>, Кабанов А.В.<sup>1,3</sup>, Клячко Н.Л.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1-11Б, Россия

<sup>2</sup> Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

<sup>3</sup> University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

e-mail: buttonightwedance45@gmail.com

Получены магнитные липосомы (МЛип) с агрегатами наночастиц магнетита (МНЧ) в липидном бислое. Показано, что при действии низкочастотного переменного магнитного поля (НЧ ПМП) на полученную систему происходит механическое воздействие агрегатов МНЧ на мембрану липосом, что можно использовать для управляемого высвобождения лекарств.

**Ключевые слова:** магнитные липосомы; низкочастотное магнитное поле, наномедицина, доставка и высвобождение лекарства

Липосомы с загруженными магнитными наночастицами (МНЧ) являются универсальной платформой для тераностики, и как потенциальный противоопухолевый носитель, и как МРТ-агент. Для липосом характерна низкая скорость высвобождения лекарств или биоактивных молекул. Использование инициированного магнитным полем высвобождения веществ из МЛип является возможной стратегией создания эффективной в терапевтических и диагностических областях системы. Целью данной работы было получение МЛип, способных высвободить модельные препараты под действием НЧ ПМП. Гидрофобные магнетитовые наночастицы, синтезированные при термическом разложении ацетилацетоната железа (III), были использованы для получения липосом путем гидратации тонкой пленки с последующей экструзией.

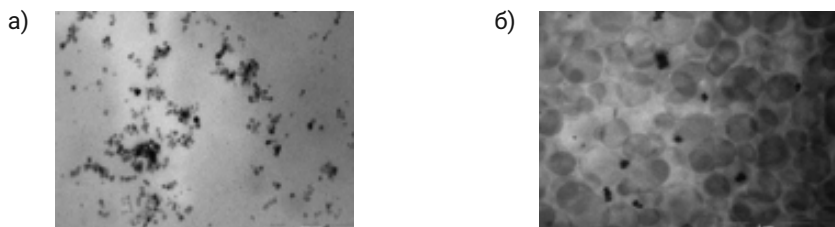


Рис. 1. ПЭМ микрофотографии МНЧ (а) и магнитных липосом (б).

Полученные липосомы имели средний диаметр 139 нм (PDI 0.09), согласно данным DLS, и были стабильны в PBS (pH 7.4). Содержание Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> составляло 1.2 мкг/мл, согласно данным атомной эмиссионной спектроскопии. Морфология полученных липосом изучена методом просвечивающей электронной микроскопии (рис.1б). Для оценки профиля высвобождения использовали в качестве модельных препаратов кальцеин и доксорубин. Как следует из кривых высвобождения (рис.2), изменение проницаемости мембраны, вызванное движениями агрегатов МНЧ в магнитном поле, более выражено в случае кальцеина (рис.2а), чем в случае доксорубина, который, как известно, легче проникает в липидный бислой (рис.2б).

Таким образом, в работе была получена липосомальная система с контролируемым высвобождением для возможного применения в тераностике.

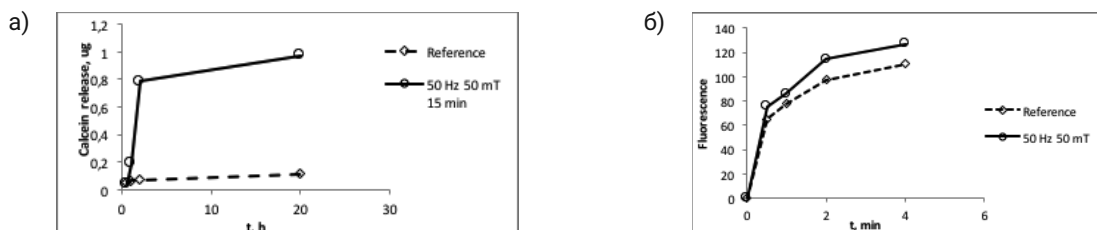


Рис. 2. Высвобождение кальцеина (а) и доксорубина (б) из МЛип под действием НЧ-ПМП.

Исследования проводились при поддержке грантов РФФИ-14-13-00731 и РФФИ 17-54-33027 с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

UDC 577.15.

## MAGNETIC LIPOSOMES WITH NANOPARTICLE CLUSTERS IN BILAYERS FOR REMOTE-CONTROLLED DRUG RELEASE

Petrinin A.V.<sup>1</sup>, Vlasova K.Yu.<sup>1</sup>, Le-Deygen I.M.<sup>1</sup>, Zhigachev A.O.<sup>2</sup>, Prusov A.N.<sup>1</sup>, Golovin Y.I.<sup>1,2</sup>, Kabanov A.V.<sup>1,3</sup>, Klyachko N.L.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Leninskie Gory, 1-11B, Russia

<sup>2</sup> G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

<sup>3</sup> University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

e-mail: buttonightwedance45@gmail.com

Magnetic liposomes with magnetite nanoparticle (MNP) clusters in the lipid bilayer were obtained. It was shown that MNP clusters exposed to low-frequency alternating magnetic field (LF-AMF) affect mechanically the liposomal membrane increasing its permeability. The effect observed can be used for remote-controlled drug release.

**Key words:** magnetic liposomes; low frequency magnetic field, nanomedicine, drug delivery and controlled release

Liposomes with encapsulated magnetic nanoparticles (magnetite, maghemite) are a universal theranostic platform, which is investigated as a potential anticancer drug carrier and MRI imaging agent. However, liposomes usually suffer from poor release of drugs or bioactive molecules. Use of magnetic field triggered release from magnetic liposomes is a possible strategy to make this platform highly efficient in therapeutic and diagnostic applications. The aim of this work was to manufacture and characterize magnetic liposomes that can release model drugs under a low-frequency magnetic field. Hydrophobic magnetite nanoparticles, which were synthesized by high-temperature decomposition of iron (III) acetyl acetonate, were used to prepare liposomes via thin film hydration, followed by extrusion. The obtained liposomes had a mean diameter of 139 nm (PDI of 0.09), according to the DLS data, and were stable in PBS (pH 7.4) for at least a week. The Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> content was 1.2 µg/ml, according to the atomic emission spectroscopy data. Morphology of the obtained liposomes can be seen from transmission microscopy data (Fig.1 b).

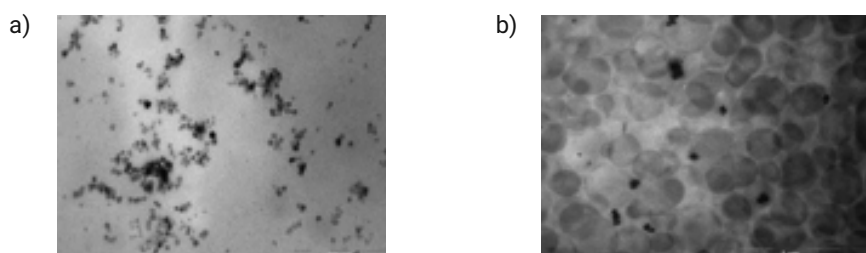


Figure 1. TEM micrographs of magnetite nanoparticles (a) and magnetic liposomes (b).

To evaluate the release profile, calcein and doxorubicin were used as model drugs. As seen from the release curves (Fig. 2), the change in membrane permeability, induced by the magnetic nanoparticle motions in the magnetic field, is more pronounced in the case of the membrane impermeable dye, calcein (Fig. 2 a) than in the case of doxorubicin that is known of penetrating the lipid bilayer easier (Fig. 2 b).

In conclusion, in the work presented, we prepared successfully a controlled release platform based on magnetic liposomes for possible further theranostic applications.

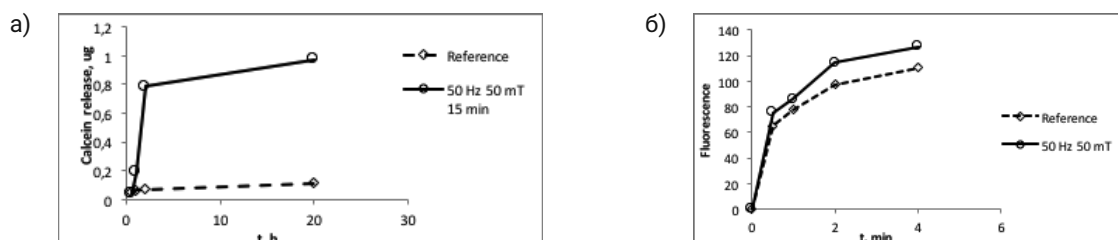


Figure 2. Release profiles of calcein (a) and doxorubicin (b) from magnetic liposomes under a low-frequency magnetic field.

Investigation was supported by RSF-14-13-00731 and RFBR 17-54-33027 grants and M.V. Lomonosov Moscow State University Program of Development.

УДК: 544.77, ББК: 24.6

## МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕРАНОСТИКОВ

А.С.Семкина<sup>1</sup>, М.А.Абакумов<sup>1</sup>, А.С.Скоригов<sup>3</sup>, А.В.Иванова<sup>4</sup>, А.Г.Мажуга<sup>5</sup>, В.П.Чехонин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Россия, Москва, alevtina.semkina@gmail.com, 89857771089

<sup>2</sup> EMAT - Антверпенский университет, alexander.skorikov@gmail.com,

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО "Московский технологический университет", Россия, Москва, super.fosforit@yandex.ru, 89032233770

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО РХТУ им. Д.И. Менделеева / ФГАОУ ВО НИТУ «МИСиС», Россия, Москва, alexander.majouga@gmail.com

В последнее время все большее развитие получает такое направление биомедицины как тераностика. В рамках данного подхода разрабатываются бифункциональные агенты, с помощью которых можно осуществлять и терапию, и диагностику определенного заболевания. Среди препаратов-тераностиков наиболее многочисленными являются наноматериалы ввиду их уникальных свойств. Однако несмотря на все многообразие разрабатываемых наносистем, в настоящее время ни одна из них не используется в клинической практике. Чаще всего это объясняется тем, что они оказываются токсичными или не способны выполнять и терапевтическую, и диагностическую функцию одинаково эффективно. Принимая данный факт во внимание, а также ввиду того, что онкологическая смертность продолжает стремительно увеличиваться, мы поставили перед собой задачу разработать низкотоксичный, биосовместимый нанолекарственный препарат, способный осуществить раннюю диагностику злокачественных новообразований и специфичную доставку химиопрепарата к опухолевым клеткам.

**Ключевые слова:** магнитные наночастицы, химиотерапия, онкологические заболевания, магнитно-резонансная томография, тераностика

Чтобы добиться поставленной цели мы обратили свое внимание на магнитные наночастицы оксида железа, которые обладают целым рядом привлекательных свойств: процесс их синтеза достаточно простой, экономически привлекательный и хорошо воспроизводимый. Наличие магнитных свойств позволяет использовать такие наночастицы в качестве контрастных агентов для МРТ-исследований, а развитая поверхность позволяет проводить конъюгации с различными функциональными молекулами, такими как флуоресцентные метки, антитела, полипептиды, лекарственные препараты и др. Кроме того, наночастицы оксида железа являются биосовместимыми и успешно могут быть метаболизированы в организме человека.

В качестве метода получения наночастиц оксида железа нами было выбрано термическое разложение ацетилацетоната железа (III) в бензиловом спирте. Скорость нагрева и длительность реакции позволяет получать наночастицы различного состава (магнетит или маггемит) и размера, но одинаковой сферической формы, что было подтверждено данными просвечивающей электронной микроскопии. Для того чтобы исключить возможную токсичность наночастиц оксида железа ввиду образования активных форм кислорода в живых клетках, производили покрытие наночастиц белковой оболочкой, состоящей из бычьего или человеческого сывороточного альбумина. Гидродинамический диаметр покрытых оболочкой наночастиц оценивался методом динамического светорассеяния и составлял 25-40 нм. Морфология и состав оболочки были подтверждены в ходе просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения с параллельным элементным анализом. Была показана высокая стабильность наночастиц оксида железа в физиологических условиях, отсутствие генотоксичности (данные теста ДНК-комет) и низкий уровень генерации активных форм кислорода (данные DCFDA теста). Магнитные наночастицы продемонстрировали высокие значения T2 релаксивности, наличие суперпарамагнитных свойств и эффективно накапливались в опухоли головного мозга, молочной железы и печени, обеспечивая визуализацию патологий в ходе проведения МРТ исследований.

На следующем этапе проводилась загрузка противоопухолевых препаратов на магнитные наночастицы. Оптимальная емкость загрузки Доксорубина составила 8 масс.%, Цисплатина - 20%. При образовании комплекса с магнитными наночастицами терапевтическая активность препаратов сохранялась, что продемонстрировали данные МТТ-тестов на линиях опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы мыши 4Т1 и глиомы крысы С6. Была установлена зависимость высвобождения лекарств с поверхности магнитных наночастиц от внешних условий среды, таких как ионная сила, значение pH, наличие

конкурирующих за связывание ионов. Характер зависимостей объяснялся природой взаимодействия лекарственных молекул и наночастиц: электростатической и/или координационной.

Была продемонстрирована возможность создания векторных магнитных наночастиц путем конъюгации с моноклональными антителами к фактору роста эндотелия сосудов, экспрессия которого повышена во многих солидных опухолях. Полученные векторные наночастицы показали свою иммуно-химическую активность как в иммуно-ферментном анализе, так и в экспериментах *in vitro* на линии клеток 4T1. Так, иммуноцитохимическое исследование и проточная цитофлуориметрия показали увеличенное накопление векторных наночастиц по сравнению с их не векторными аналогами без антител. С помощью конфокальной микроскопии удалось продемонстрировать, что магнитные наночастицы с антителами более эффективно доставляют Доксорубин в опухолевые клетки. На финальном этапе проводились эксперименты *in vivo* на мышах с экспериментальной моделью аденокарциномы молочной железы 4T1, которые показали, что терапия с применением векторных магнитных наночастиц, загруженных Доксорубином, в 1,5 раза увеличила медиану выживаемости животных по сравнению со свободным лекарственным препаратом Доксорубином.

Таким образом, нам удалось получить биосовместимый и низкотоксичный препарат-тераностик на основе магнитных наночастиц оксида железа, способный обеспечить эффективное проведение МРТ-диагностики онкологических заболеваний и их химиотерапию. Полученные данные открывают новые возможности для получения целого ряда препаратов-тераностиков различной направленности.

#### Литература:

S. Okada, *Iron-induced tissue damage and cancer: The role of reactive oxygen species-free radicals*, *Pathol. Int.* 46 (1996) 311–332. J.W.M. Bulte, D.L. Kraitchman, *Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging*, *NMR Biomed.* 17 (2004) 484–499. V.P. Chekhonin, S. A. Shein, A.A. Korchagina, O.I. Gurina, *VEGF in tumor progression and targeted therapy*, *Curr. Cancer Drug Targets.* 13 (2013) 423–443. Wahajuddin, S. Arora, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers*, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 3445–3471. N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, *Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications*, *Nanotoday.* 5 (2010) 213–230. H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 71–79.

**Финансирование:** Работа была выполнена при поддержке гранта РФФ № 17-74-10169

UDC 544.77, BBC 24.6

## MAGNETIC NANOPARTICLES AS A PROMISING MATERIAL FOR THERANOSTICS CREATION

A.Semkina <sup>1</sup>, M.Abakumov <sup>1</sup>, A.Skorikov <sup>3</sup>, A.Ivanova <sup>4</sup>, A.Majouga <sup>5</sup>, V.Chekhonin <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Russia, Moscow, ,  
Science and Technology MISiS (NUST MISiS), Russia, Moscow, ,

<sup>3</sup> EMAT – University of Antwerp,

<sup>4</sup> Moscow Technological University, Russia, Moscow,

<sup>5</sup> Dmitry Mendeleev University / The National University of Science and Technology MISiS (NUST MISiS), Russia, Moscow

Recently, the direction of biomedicine as theranostics has been increasingly developing. Within the framework of this approach, bifunctional agents are developed, and using them it is possible to carry out both therapy and diagnosis of a particular disease. Among the theranostic drugs, nanomaterials are the most numerous due to their unique properties. However, despite the variety of nanosystems being developed, none of them are currently used in clinical practice. Most often this is due to the fact that they are toxic or unable to perform both the therapeutic and diagnostic function equally effectively. Taking this fact into account, and also because cancer mortality continues to increase rapidly, we set ourselves the task of developing a low-toxic, biocompatible nanotheranostic, which is capable of early diagnosis of cancer and specific delivery of chemotherapy drugs to tumor cells.

**Key words:** magnetic nanoparticles, chemotherapy, cancer, magnetic resonance imaging, theranostics

To achieve this goal, we turned our attention to magnetic iron oxide nanoparticles, which have a number of attractive properties: the process of their synthesis is simple enough, economically attractive and well reproducible. The presence of magnetic properties makes it possible to use such nanoparticles as contrast agents for MRI studies, and the developed surface allows conjugation with various functional molecules, such as fluorescent

labels, antibodies, polypeptides, drugs, etc. In addition, iron oxide nanoparticles are biocompatible and can be successfully metabolized in the human body.

As a method for obtaining iron oxide nanoparticles, we chose the thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in benzyl alcohol. The rate of heating and the duration of the reaction make it possible to obtain nanoparticles of various compositions (magnetite or maghemite) and size, but of the same spherical shape, which was confirmed by transmission electron microscopy. In order to exclude the possible toxicity of the iron oxide nanoparticles due to the formation of reactive oxygen species in living cells, the nanoparticles were coated with a protein shell consisting of bovine or human serum albumin. The hydrodynamic diameter of coated nanoparticles was estimated by dynamic light scattering and was 25-40 nm. The morphology and composition of the coating were confirmed by high-resolution transmission electron microscopy with parallel elemental analysis. High stability of iron oxide nanoparticles under physiological conditions, lack of genotoxicity (DNA comet test data), and low generation of reactive oxygen species (DCFDA test data) were demonstrated. Magnetic nanoparticles showed high T2 relaxivity values, the presence of superparamagnetic properties and effectively accumulated in tumors of brain, breast and liver, providing pathologies visualization during MRI studies.

At the next stage, antitumor drugs were loaded onto magnetic nanoparticles. The optimal loading capacity of Doxorubicin was 8 wt.%, Cisplatin - 20%. When the complex with magnetic nanoparticles was formed, drug therapeutic activity was preserved, which was demonstrated by MTT tests on the lines of tumor cells: mouse breast adenocarcinoma 4T1 and rat glioma C6. The dependence of drug release from the surface of magnetic nanoparticles on the external environmental conditions, such as ionic strength, pH, the presence of competing ions for binding, was established. The nature of the dependencies was explained by the nature of the interaction between drug molecules and nanoparticles: electrostatic and / or coordination interactions.

The possibility of synthesis of targeted magnetic nanoparticles by conjugation with monoclonal antibodies to the vascular endothelial growth factor, whose expression is enhanced in many solid tumors, was demonstrated. The resulting targeted nanoparticles showed their immuno-chemical activity in both ELISA and in vitro experiments on the 4T1 cell line. Thus, immunocytochemistry and flow cytometry showed increased accumulation of targeted nanoparticles in comparison with their non-targeted analogs without antibodies. By confocal microscopy, it was possible to demonstrate that magnetic nanoparticles with antibodies more efficiently deliver Doxorubicin to tumor cells. At the final stage, in vivo experiments were conducted with mice with experimental model of breast adenocarcinoma 4T1. This experiment showed that therapy with targeted magnetic nanoparticles loaded with Doxorubicin increased the median survival of the animals by 1.5 times in comparison with the free drug Doxorubicin.

Thus, we were able to obtain a biocompatible and low-toxic drug-thermostic on the basis of magnetic iron oxide nanoparticles, capable of efficiently performing MRI diagnostics of cancer and it's chemotherapy. The data obtained open up new possibilities for synthesis a whole series of therapeutics with various functions.

#### References:

- S. Okada, *Iron-induced tissue damage and cancer: The role of reactive oxygen species-free radicals*, *Pathol. Int.* 46 (1996) 311–332. J.W.M. Bulte, D.L. Kraitchman, *Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging*, *NMR Biomed.* 17 (2004) 484–499. V.P. Chekhonin, S. A. Shein, A.A. Korchagina, O.I. Gurina, *VEGF in tumor progression and targeted therapy*, *Curr. Cancer Drug Targets.* 13 (2013) 423–443. Wahajuddin, S. Arora, *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers*, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 3445–3471. N.T.K. Thanh, L.A.W. Green, *Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications*, *Nanotoday.* 5 (2010) 213–230. H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang, *The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 71–79.

**Grant:** We are most grateful for the continuing financial support of this research RSF grant № 17-74-10169

УДК 606:61:620.3

## МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА, ЗАГРУЖЕННЫЕ ЦИСПЛАТИНОМ, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КОНТЕЙНЕР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Иванова А.В., Семкина А.С., Скориков А.С., Абакумов М.А., Чехонин В.П.

Московский Технологический Университет (ИТХТ им. М.В. Ломоносова), Москва, Россия  
119571, Москва, пр. Вернадского, 86  
e-mail : super.fosforit@yandex.ru

Разработан метод получения стабильных, биосовместимых магнитных наночастиц оксида железа, покрытых оболочкой из ЧСА. Исследован механизм высвобождения, продемонстрирована высокая емкость загрузки частиц противоопухолевым препаратом Цисплатином за счет иммобилизации его на поверхности, и возможность его доставки в опухолевые клетки.

**Ключевые слова:** магнитные наночастицы; Цисплатин; адресная доставка; МРТ-контрастный агент.

За последние 30 лет прогресс лечения и выживаемости больных раком происходит очень медленными темпами. Одним из наиболее распространенных методов лечения онкологических заболеваний является химиотерапия, но ее неспецифическое действие на клетки организма, и возникновение вследствие этого серьезных побочных эффектов, заставляет искать возможные пути усовершенствования данного метода терапии. Особое внимание уделяют магнитным наночастицам оксида железа (МНЧ), которые являются перспективной системой для одновременной диагностики и терапии злокачественных новообразований, благодаря тому, что они сочетают в себе свойства МРТ-контрастных агентов и носителей для направленной доставки химиотерапевтических препаратов в опухолевые ткани.

Целью данной работы является разработка и характеристика системы на основе магнитных наночастиц оксида железа, способной доставлять химиотерапевтический препарат Цисплатин в опухолевые клетки и эффективно повышать контраст на изображениях магнитно-резонансной томографии.

Наночастицы оксида железа были получены в ходе термического разложения ацетилацетоната железа (III) в бензиловом спирте. Для увеличения стабильности магнитных наночастиц в водных растворах в физиологических условиях, было проведено их покрытие молекулами человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). После адсорбции белка на поверхности частиц, образующееся покрытие было стабилизировано с помощью ковалентной перешивки свободных аминогрупп ЧСА. Полученные частицы имеют средний гидродинамический диаметр  $23,1 \pm 0,7$  нм. Гидродинамический диаметр и  $\zeta$ -потенциал определялись с помощью метода динамического светорассеяния. T2-релаксивность частиц оценивалась в экспериментах на МРТ. Концентрации Fe и Pt в образцах определялись с помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии. Цитотоксичность МНЧ, оценивалась в МТТ-тестах на клетках аденокарциномы 4Т1.

В качестве доказательства загрузки Цисплатина на наночастицы оксида железа, покрытых оболочкой ЧСА, была проведена просвечивающая электронная микроскопия. Частицы устойчивы к агрегации в растворах, моделирующих плазму крови и демонстрируют низкую цитотоксичность, что обеспечивается наличием биосовместимого белкового покрытия. Частицы обладают суперпарамагнитными свойствами и высокой T2-релаксивностью ( $161,2$  мМ $\cdot$ с $^{-1}$ ), что превосходит показатели коммерческих препаратов и свидетельствует о высоком потенциале полученных нами частиц в аспекте МРТ визуализации. Противоопухолевый препарат Цисплатин был иммобилизован на поверхности частиц за счет координационных взаимодействий с аминокислотами, входящими в состав белка. Оптимальная емкость загрузки составила 20% по массе. Кинетика высвобождения лекарственного препарата из контейнера является ключевым параметром для контейнерных систем направленной доставки. Наночастицы, загруженные Цисплатином, высвобождают препарат со скоростью, соответствующей ориентировочной кинетике накопления контейнера в тканях, и демонстрируют цитотоксичность по отношению к клеткам аденокарциномы молочной железы 4Т1.

Таким образом, полученные данные определяют высокий потенциал разработанной системы в аспекте направленной доставки Цисплатина в опухолевые ткани и визуализации его распределения в организме методом МРТ.

UDK 606:61:620.3

## MAGNETIC NANOPARTICLES OF IRON OXIDE LOADED BY CISPLATINUM AS A PERSPECTIVE CONTAINER FOR DIAGNOSTICS AND THERAPY OF MALIGNANT NOVELTIES

Ivanova A.V., Semkina A.S., Abakumov M.A., Skorikov A.S., Chekhonin V.P.

Moscow Technological University (IFCT named after by M.V. Lomonosov), Moscow, Russia  
119571, Moscow, Vernadsky avenue, 86  
e-mail : super.fosforit@yandex.ru

A method for obtaining stable, biocompatible magnetic nanoparticles of iron oxide coated with HSA is developed. The release mechanism was studied, a high capacity of particle loading with the anticancer drug Cisplatinum was demonstrated due to its immobilization on the surface, and the possibility of its delivery to tumor cells.

**Key words:** magnetic nanoparticles; Cisplatinum; drug delivery; MRI-contrast agents.

For the last 30 years progress of treatment and survival of cancer patients happens very sluggish rates. One of the most widespread methods of treatment of oncological diseases is the chemotherapy, but its nonspecific action on organism cages, and emergence thereof serious ghost effects, forces to look for possible paths of improvement of this method of therapy. Special attention is paid to magnetic nanoparticles of iron oxide (MNPs) which are perspective system for simultaneous diagnostics and therapy of malignant novelties, thanks to the fact that they combine MRI-contrast agents and carriers for drug delivery of chemotherapeutic drug in tumor tissue.

The purpose of this work is development and a characterization of system on the based of magnetic nanoparticles of iron oxide, capable to deliver the chemotherapeutic drug Cisplatinum in tumor cells and to efficiently increase contrast on images of magnetic resonance imaging.

Synthesis of MNPs by thermal decomposition of iron acetylacetonate (III) in benzyl alcohol. For increase in stability of magnetic nanoparticles in aqueous solutions in physiological conditions, the capping was carried out by molecules of the human serum albumin (HSA) them. After adsorption of protein on surfaces of particles, the formed capping it was stabilized by means of the covalent alteration of the free amino groups of HSA. The received particles have effective hydrodynamic diameter  $23,1 \pm 0,7$  nm.. Hydrodynamic diameter and  $\zeta$ -potential decided on the help of a method of dynamic light scattering. T2-relaxivity particles it was estimated in experiments on MRI. Concentration of Fe and Pt in samples decided on the help of a method of an Atomic Emission spectroscopy. Cytotoxic activity of MNPs, was estimated in MTT-assay on cages of an adenocarcinoma 4T1.

As the proof of loading of Cisplatinum on nanoparticles of iron oxide, HSA capped with an envelope, the Transmission electron microscopy was carried out. Particles are steady against aggregation in solution, modeling a blood plasma, and show low cytotoxic activity that is provided with existence of a biocompatible proteinaceous capping. Particles have superparamagnetic properties and high T2-relaxivity ( $161,2$  mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) that surpasses indicators of commercial medicines and testifies to the high potential of the particles received by us in aspect of MRI of visualization. The anticancer drug Cisplatinum was immobilized on a surface of particles due to coordination interactions with the amino acids which are a part of protein. The loading capacity of the nanoparticles was 20 wt. %. The kinetics of a release of a medicinal drug from a container is the key parameter for the container systems of directional delivery. The nanoparticles loaded by Cisplatinum release drug with a speed, the corresponding approximate kinetics of accumulation of a container in tissue, and show cytotoxicity in relation to cages of an adenocarcinoma of a mammary gland 4T1.

Now therefore, the obtained data in determine the high capacity of the developed system in aspect of directional delivery of anticancer drug of Cisplatinum in tumor tissues and visualization of its distribution in an organism by the MRI method.

УДК 577.151.42

## МАГНИТОРАЗДЕЛЯЕМЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР НА ОСНОВЕ ГЛЮКООКСИДАЗЫ ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ D-ГЛЮКОЗЫ

Е.П.Голикова, Н.В.Лакина, В.Г.Матвеева

ФГБОУ ВО "Тверской государственный технический университет", Россия, 170026, Тверь, наб. А.Никитина, 22, golikova87@rambler.ru, +74822789348

В работе рассматривается биокаталитический способ окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты с использованием магниторазделяемых систем. Предлагаемый биокаталитический способ получения глюконовой кислоты характеризуется высокой эффективностью (90%).

**Ключевые слова:** глюкоза, глюконовая кислота, глюкооксидаза, биокатализаторы

Биокаталитический способ окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты с использованием неорганических носителей и магниторазделяемых систем является перспективным направлением в области биотехнологии, так как данный способ позволяет увеличить выход целевого продукта и повысить ее экологичность синтеза [1]. Глюкозооксидаза - фермент, класса оксидоредуктаз ускоряющий окисление D-глюкозы до D-глюконовой кислоты. Глюкозооксидаза в кристаллическом виде, представляет собой димерный фермент, состоящий из 2 молекул флавинадениндинуклеотида. [2].

В качестве альтернативных носителей для ферментных молекул могут с успехом применяться магнитные наночастицы [3-5].

В работе получен магниторазделяемый биокатализатор на основе глюкозооксидазы и исследован в процессе синтеза глюконовой кислоты. Несмотря на большое разнообразие способов синтеза магнитных наночастиц, самым доступным и простым способом является метод химического соосаждения солей железа Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> в щелочной среде, в атмосфере азота при 250С.

Проводилось сравнение активности биокатализатора на основе иммобилизованной глюкозооксидазы на магнитные наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и нативного фермента. Активность биокатализатора оценивалась по содержанию глюконовой кислоты (масс.%) в реакционной смеси по окончании процесса. По результатам исследования процесса окисления D-глюкозы до глюконовой кислоты установлено, что при использовании иммобилизованной глюкозооксидазы на магнитных наночастицах Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> выход глюконовой кислоты составил 90% (в случае нативного фермента выход глюконовой кислоты составил 100%).

Предлагаемый способ окисления D-глюкозы до D-глюконовой кислоты в присутствии биокатализатора – глюкозооксидазы, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, можно рассматривать в качестве альтернативы существующим методам. Данный метод получения глюконовой кислоты характеризуется высоким выходом целевого продукта (90%).

### Литература:

1. Maki-Arvela P., et al. Synthesis of Sugars by Hydrolysis of Hemicelluloses //Chem. Rev.2011. №111. p. 5638-5640.
2. Bankar S. B., Bule M.V., Singhal R. S., Glucose oxidase – An overview // Biotechnology Advances. 2009. №27. p. 490-491.
3. Bayramoglu G. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads // Journal of Hazardous Materials. 2008. №156. p. 148-155;
4. Corgie S.C., et al. Self-Assembled Complexes of Horseradish Peroxidase with Magnetic Nanoparticles Showing Enhanced Peroxidase Activity// Adv.Funct. Mater. 2012. №22. p. 1940–1951;
5. Deepthi S.S., et al. Approach towards the Synthesis of Enantio Pure Diols Using Horse Radish Peroxidase Enzyme Immobilized on Magnetic Nanoparticles //Green and Sustainable Chemistry. 2014. №4. p. 15-19.

**Финансирование:** Работа была выполнена в рамках проекта 18-08-00468 финансируемого РФФИ.



UDC 577.151.42

## MAGNETICALLY SEPARABLE BIOCATALYST ON THE BASIS OF GLUCOSE OXSIDASE

E.Golikova, N.Lakina, V.Matveeva

Tver State Technical University, Russia, 170026, Tver, A. Nikitin emb., 22

In the paper, the biocatalytic oxidation of d-glucose to d-gluconic acid using magnetically separable systems is studied. The proposed biocatalytic method of gluconic acid obtaining can be characterized by high efficiency (90%).

**Key words:** glucose, gluconic acid, glucose oxidase, biocatalysts

The biocatalytic method of oxidation D-glucose to D- gluconic acid with use the inorganic supports and the magnetically separable systems is the perspective direction in the field of biotechnology. This method allows to increase an exit of a target product and to increase environmentally friendly compatibility of synthesis [1]. The glucose oxidase is the enzyme of oxidoreductases type allowing oxidizing of D-glucose to gluconic acid. The glucose oxidase in crystalline form is a dimeric enzyme consisting of 2 molecules of flavin adenine dinucleotide. The molecular weight of the subunits of the glucose oxidase is 80 kDa. The enzyme shows maximum activity at 40°C and pH 5.0 [2].

The magnetic nanoparticles can be successfully used as alternative supports for enzyme molecules[3-5].

The paper obtained magnetically separable biocatalyst based glucose oxidase and investigated in the synthesis of gluconic acid. Despite the great variety of methods of synthesis of magnetic nanoparticles, the most affordable and simple method is the method of chemical coprecipitation of iron salts Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> in an alkaline environment, in an atmosphere of nitrogen at 250C.

In the work, a comparison was made of the activity of the biocatalyst based on immobilized glucose oxidase on magnetic nanoparticles Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and native enzyme. The activity of the biocatalyst was assessed by the content of gluconic acid (wt.%) in the reaction mixture at the end of the process. According to the study of the oxidation of D-glucose to gluconic acid found that when using immobilized glucose oxidase on magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles the yield of gluconic acid amounted to 90% (in the case of the native enzyme gluconic acid yield was 100%).

The proposed method for the oxidation of D-glucose to D-gluconic acid in the presence of a biocatalyst – glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> can be considered as an alternative to existing methods. This method of obtaining gluconic acid is characterized by a high yield of the target product (90%).

### References:

1. Maki-Arvela P., et al. *Synthesis of Sugars by Hydrolysis of Hemicelluloses* //Chem. Rev.2011. №111. p. 5638-5640.
2. Bankar S. B., Bule M.V., Singhal R. S., *Glucose oxidase – An overview* // Biotechnology Advances. 2009. №27. p. 490-491.
3. Bayramoglu G. *Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads* // Journal of Hazardous Materials. 2008. №156. p. 148-155;
4. Corgie S.C., et al. *Self-Assembled Complexes of Horseradish Peroxidase with Magnetic Nanoparticles Showing Enhanced Peroxidase Activity* //Adv.Funct. Mater. 2012. №22. p. 1940–1951;
5. Deepthi S.S., et al. *Approach towards the Synthesis of Enantio Pure Diols Using Horse Radish Peroxidase Enzyme Immobilized on Magnetic Nanoparticles* //Green and Sustainable Chemistry. 2014. №4. p. 15-19.

**Grant:** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Researches (18-08-00468)

УДК 57.03

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ODE-МОДЕЛЬ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ПРОЦЕССОВ ОСТЕОГЕНЕЗА ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ С ПОМОЩЬЮ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ С РЕКОМБИНАНТНЫМИ ФАКТОРАМИ BMP-2 И ЭРИТРОПОЭТИНОМ

Демиденко А.В.<sup>1</sup>, Громов А.В.<sup>1</sup>, Карягина А.С.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им.

М.В. Ломоносова, Москва, Россия

119991, Москва, ул. Хохлова, стр. 40

<sup>3</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42

e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

С целью оптимизации разработки новых, более безопасных и эффективных, материалов для реконструктивной хирургии, основанных на использовании рекомбинантных факторов роста BMP-2 и эритропоэтина, создана математическая ODE-модель для описания процессов остеогенеза, позволяющая проводить оптимизацию соотношения и снижение концентраций белковых факторов.

**Ключевые слова:** математическая ODE-модель, эритропоэтин, BMP-2, остеогенез

Важная задача медицинской биотехнологии – разработка новых материалов для реконструктивной хирургии на основе рекомбинантных факторов BMP-2 и эритропоэтина – требует использования комплексного подхода с применением экспериментальных методов, а также методов математического моделирования. Один из таких методов – разработка математической предиктивной модели остеогенеза с участием факторов BMP-2 и эритропоэтина (с использованием специализированного ПО – Cell Designer, Copasi, DBSolve) с целью предсказания и коррекции используемых концентраций белковых факторов. Подбор оптимального соотношения и снижение концентраций белковых факторов существенно повысит безопасность материала по сравнению с коммерческими аналогами. Для построения схемы модели (см. рисунок) в специализированном ПО для графического отображения взаимодействий в математических моделях Cell Designer (<http://www.celldesigner.org/>), использующем SBGN (Systems Biology Graphical Notation, <http://sbgn.github.io/sbgn/>), проанализированы литературные источники, описывающие основные компоненты в системе имплантат – остеогенные факторы – место имплантации, их взаимодействия и динамические эффекты, вызываемые высвобождаемыми из имплантата остеогенными факторами, в первую очередь выражающиеся в образовании новой костной ткани в месте имплантации.

Полученная схема модели преобразована в файл математической ODE (Ordinary Differential Expressions) модели на языке SBML (Systems Biology Markup Language, [http://sbml.org/Main\\_Page](http://sbml.org/Main_Page)) в ПО Copasi и DBSolve. Для придания созданной модели предиктивных свойств (поведения, близкого к реальной биологической системе) проведен фиттинг (подбор параметров в дифференциальных уравнениях) модели с помощью найденных в литературе наборов данных, количественно характеризующих взаимодействия между компонентами модели и описывающих конечные эффекты воздействия различных концентраций остеогенных факторов (например, эффективные концентрации рекомбинантных BMP-2 и эритропоэтина в области имплантации остеопластического материала и концентрационные зависимости уровня и характера остеогенеза в ответ на применение этих факторов). Модель протестирована на независимом наборе экспериментальных данных, в частности, на данных из работы Cowan с соавторами. Полученная модель может быть использована для дальнейшей работы с экспериментальными данными, полученными на реальной модели остеогенеза с целью описания, предсказания и коррекции концентраций белковых компонентов в конечном препарате.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 16-15-00133).

Литература:

Cowan C.M. et al. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng.* –2007. –V. 13, No 3. –P. 501–512.

UDC 57.03

## A MATHEMATICAL ODE-MODEL FOR SIMULATION OF OSTEOGENESIS DURING THE REGENERATION OF BONE TISSUE DEFECTS BY USING OSTEOPLASTIC MATERIALS WITH RECOMBINANT FACTORS BMP-2 AND ERYTHROPOEITIN

Demidenko A.V.<sup>1</sup>, Gromov A.V.<sup>1</sup>, Karyagina A. S.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

123098, Moscow, Gamalei st., 18

<sup>2</sup> Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia 119991, Moscow, Khokhlova st., 40

<sup>3</sup> All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

127550, Moscow, Timiryazevskaya st., 42

e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

In order to optimize the development of new, safer and more effective materials for reconstructive surgery, based on the use of recombinant growth factors BMP-2 and erythropoietin, a mathematical ODE-model for simulation of osteogenesis, which allows to optimize the ratio and decrease the protein concentration, was developed.

**Key words:** mathematical ODE-model, erythropoietin, BMP-2, osteogenesis.

An important aim of medical biotechnology – the development of new materials for reconstructive surgery based on recombinant factors BMP-2 and erythropoietin – requires the use of a complex approach involving experimental methods, as well as mathematical modeling. One of the methods is the development of a predictive model of osteogenesis stimulated by BMP-2 and erythropoietin (using specialized software – Cell Designer, Copasi, DBSolve) to predict and correct the concentrations of protein factors. Optimal ratio selection and reduction of protein concentrations will significantly increase the safety of the material in comparison with commercial analogues. We constructed a model diagram (see figure) in a specialized software for graphical description of interactions in mathematical models of Cell Designer (<http://www.celldesigner.org/>) using SBGN (Systems Biology Graphical Notation, <http://sbgn.github.io/sbgn/>). For this purpose, literature sources describing the main components in the implant system – osteogenic factors – the place of implantation, their interactions and dynamic effects caused by the factors released from the implant, primarily expressed in the formation of a new bone tissue at the site of implantation, were analyzed.

The resulting model diagram was converted into a mathematical ODE (Ordinary Differential Expressions) model file in SBML (Systems Biology Markup Language, [http://sbml.org/Main\\_Page](http://sbml.org/Main_Page)) software Copasi and DBSolve. To give the created model predictive properties (behavior close to the real biological system), a fitting (selection of parameters in differential equations) of the model was carried out using data sets found in the literature, quantifying the interaction between the components of the model and describing the final effects of various concentrations of osteogenic factors (for example, effective concentrations of recombinant BMP-2 and erythropoietin in the place of implantation of osteoplastic material and concentration relation of the level and type of osteogenesis in response to the use of these factors). The model is tested on an independent set of experimental data, particularly on data from work of Cowan and co-authors. The obtained model can be used for further work with the experimental data from the real osteogenesis model to simulate, predict and correct the concentration of protein components in the final product.

### References:

Cowan C.M. et al. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng.*–2007. –V. 13, No 3. –P. 501–512.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 16-15-00133).

УДК 57.086.83

## МАТРИКСЫ И МИКРОСФЕРЫ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Чеснокова Д. В., Жаркова И. И., Волков А.В., Стамболиев И.А., Мураев А.А., Бонарцев А. П.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
e-mail: daryana8@yandex.ru

Получены пористые микросферы и 3D-матрикссы из поли-3-оксибутирата, биосовместимость и остеокондуктивный эффект которых открывает возможность использовать эти биополимерные изделия для инженерии костной ткани.

**Ключевые слова:** поли-3-оксибутират, биodeградируемый полимер, 3D-матрикс, микросферы, мезенхимальные стволовые клетки, инженерия костной ткани.

Поли-3-оксибутират (ПОБ) – биосовместимый биodeградируемый полимер, получаемый микробиологическим путем с помощью штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б. Этот материал открывает большие возможности применения в регенеративной медицине для восстановления целостности поврежденных органов и тканей. В качестве подложки для культивирования клеток можно использовать полимерные изделия различной формы и микроструктуры: пористые матрикссы и микросферы. Особенно важна форма и микроструктура подложки для роста и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК), интерес к использованию которых для регенеративной медицины активно растет в последние годы.

Целью данной работы было исследование роста и остеодифференцировки мезенхимальных стволовых клеток на 3D-матриксах и пористых микросферах различного диаметра из ПОБ.

Для создания микросфер использовалась техника эмульгирования гомогенизированной смеси раствора ПОБ с карбонатом аммония, использовавшегося в качестве порообразователя, в растворе ПВС. Пористые матрикссы были изготовлены с помощью метода двойного выщелачивания с использованием двух порогенов – карбоната аммония и сахарозы с заданным размером кристаллов. МСК были выделены из костного мозга крыс и охарактеризованы методом проточной цитометрии с использованием антител к поверхностным маркерам фенотипирования стволовых клеток. Для изучения характера роста МСК спустя неделю инкубации были получены фотографии образцов микросфер и матриксов методом сканирующей электронной микроскопии. Остеокондуктивные свойства матриксов и микросфер (диаметром 125 мкм) были исследованы на некритическом дефекте бедренной кости и критическом дефекте теменной кости черепа крысы.

Было показано, что МСК прикрепляются и растут как на микросферах, так и на 3D-матриксах. Исследование характера роста клеток методом СЭМ показало, что клетки распластываются по поверхности микросфер с диаметром около 700 мкм и формируют монослой. Микросферы со средним диаметром около 125 мкм показали способность образовывать небольшие агрегаты, соединенные клетками. Было продемонстрировано остеокондуктивное действие матриксов и микросфер на основе ПОБ на некритическом и критическом дефекте костной ткани крыс *in vivo*.

Таким образом, было показано, что не только матрикссы, но и микросферы на основе ПОБ можно использовать для заполнения дефектов костной ткани.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ офи-м № 15-29-04856.

UDC 57.086.83

## SCAFFOLDS AND MICROSPHERES FROM POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Chesnokova D. V., Zharkova I. I., Volkov A. V., Stamboliev I. A., Muraev A. A., Bonatsev A. P.

Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia  
 119234, Russia, Moscow, Leninskiye Gory, 1, page 12  
 e-mail: daryana8@yandex.ru

Biocompatibility and osteoconductive effect of porous microspheres and 3D-matrices from poly(3-hydroxybutyrate) open up the possibility to use this biopolymer devices for bone tissue engineering.

**Key words:** poly(3-hydroxybutyrate), biodegradable polymer, 3D-scaffold, microspheres, mesenchymal stem cells, bone tissue engineering.

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) is a biocompatible and biodegradable polymer produced by a microbiological way by strain-producer *Azotobacter chroococcum* 7B. This material opens up great possibilities for application in regenerative medicine to restore the integrity of damaged organs and tissues. As a substrate for culturing cells the polymer devices of various shapes and microstructures can be used: porous scaffolds and microspheres. Of particular importance is the shape and microstructure of the substrate for growth and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCS), the interest in using them for regenerative medicine is growing rapidly in recent years.

The aim of this work was to study growth and differentiation in osteogenic direction of mesenchymal stem cells on 3D-scaffolds and porous microspheres of different diameter from PHB.

To produce microspheres the technique of emulsification of homogenous mixture of PHB with a solution of ammonium carbonate as a blowing agent in solution of PVA was used. The porous scaffolds were made using the method of double leaching using two porogens of ammonium carbonate and sucrose with the specified size of the crystals. MSCS were isolated from bone marrow of rats and characterized by flow cytometry using antibodies to surface markers phenotyping of stem cells. To explore the growth pattern of MSCS after a week of incubation were taken the photos of these samples of the microspheres and scaffolds by scanning electron microscopy. The osteoconductive properties of scaffolds and microspheres (diameter 125  $\mu\text{m}$ ) were investigated on non-critical defect of the femur and the critical defect of the parietal bone of the skull of the rat.

It was shown that MSCS adhere and grow both on the microspheres, and 3D-scaffolds. The study of growth pattern of cells by the method of SEM showed that the cells spread on the surface of the microspheres with a diameter of about 700 microns and form a monolayer. Microspheres with an average diameter of about 125 microns showed the ability to form small aggregates of connected by cells. It was demonstrated osteoconductive effect of scaffolds and microspheres, based on PHB for non-critical and critical bone defect of rats in vivo.

Thus, it was proved that not only the scaffolds, but microspheres on the basis from PHB can be used to fill bone defects.

This work was supported by RFBR grant, project no.15-29-04856.

УДК 615.456.4

## МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ ГЛИКОКОНЪЮГАТАМИ УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ АТТРАКЦИЮ К КЛЕТКАМ ПЕЧЕНИ

Бражников Г.Т., Шиловский И.П., Колоскова О.О., Носова А.С., Хаитов М.Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия  
 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24.  
 e-mail: gt.brazhnikov@nrcii.ru

Модификация поверхности липосом, приготовленных на основе липотрипептидов неогликоконъюгатами приводит к снижению цитотоксичности и увеличивает способность транспортировать нуклеиновые кислоты в гепатоциты.

**Ключевые слова:** липосомы, направленный транспорт, гепатоциты.

**Введение.** Разработка генно-терапевтических препаратов является активно развивающимся направлением исследований [1,2]. Главная проблема, препятствующая внедрению данных препаратов в медицинскую практику - сложность доставки нуклеиновых кислот в клетки мишени. Для ее преодоления этой проблемы применяют различные носители, в том числе и липосомы [3], поверхность которых можно модифицировать для увеличения селективности. Было установлено, что асиалогликопротеиновые рецепторы на поверхности гепатоцитов способны связываться с гликопротеинами. Целью данной работы было изучение влияния модификации поверхности липосом на селективность внутриклеточного транспорта нуклеиновых кислот в клетки печени.

**Методы.** Липосомы на основе OrnOrnGlu(C16)2 были выбраны ранее, как наиболее эффективные векторы доставки нуклеиновых кислот. Мы модифицировали липосомы нейтральными углеводами - производными лактозы. К OrnOrnGlu(C16)2 добавляли один из четырех неогликоконъюгатов в количестве 5, 10 и 15%. В итоге получали 12 видов модифицированных липосом [4]. Для определения цитотоксичности использовали МТТ-тест. С помощью люциферазного теста оценивали селективность проникновения, используя линии клеток 293Т (эмбриональная почка человека) и HepG2 (клетки печени человека).

**Результаты.** Было установлено, что модифицированные липосомы состава OrnOrnGlu(C16)2-4+Lac C16 (5%) и OrnOrnGlu(C16)2-4+LacGGG16(15%) обладают наименьшей токсичностью, сопоставимой с таковой у немодифицированной OrnOrnGlu(C16)2. IC50, установленная в МТТ-тесте, составила 0,14 и 0,26 против 0,16 мг/мл. Эксперименты на культуре клеток 293Т показали, что OrnOrnGlu(C16)2-4+LacGGG16(15%) обладает повышенной в 1,5 раза трансфекционной активностью по сравнению с немодифицированной OrnOrnGlu(C16)2, в то время, как модификация OrnOrnGlu(C16)2-4+Lac C16 (5%) приводит к 6-кратному снижению трансфекционной активности. Однако способность указанных вариантов проникать в клетки печени HepG2 была выше в 15 и 25 раз, соответственно, чем для немодифицированной OrnOrnGlu(C16)2.

**Заключение.** Осуществлена модификация неогликоконъюгатами поверхности липосом, приготовленных на основе липотрипептидов. Выбраны два варианта модификации, приводящие к значительному снижению цитотоксичности и увеличению способности транспортировать нуклеиновые кислоты в гепатоциты. Предлагаемый подход модификации липосом является перспективным при разработке новых способов лечения заболеваний печени. Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-01080.

#### Литература:

1. Колоскова О.О., Носова А.С., Илюхина А.А. и др. Липосомальные средства доставки миРНК // *Биофармацевтический журнал* - 2017. - Т. 9, № 5. - С. 3-10.
2. Хаитов М.Р., Литвин Л.С., Шиловский И.П. и др. Интерференция РНК. Новые подходы к разработке противовирусных препаратов // *Иммунология* - 2010. -Т. 31, №. 2 -С. 69-76.
3. Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р. и др. Интерференция РНК - новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы // *Экспериментальная и клиническая фармакология* - 2016. -Т. 79, № 4. -С. 35-44.
4. Koloskova O.O., Nosova A.S., Shchelik I.S. et al. Liver-targeted delivery of nucleic acid by liposomes modified with a glycoconjugate // *Mendeleev Commun.* -2017. -№27. P.626-627

UDC 615.456.4

## MODIFICATION OF THE LIPOSOME SURFACE WITH GLYCOCONUGATES INCREASES THEIR ATTRACTION TO THE LIVER'S CELLS

**Brazhnikov G.T., Shilovskiy I.P., Koloskova O.O., Nosova A.S., Khaitov M.R.**

National Research Center - Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation  
115478, Russia Federation, Moscow, Kashirskoe shosse 24.  
e-mail: gt.brazhnickov@nrcii.ru

Modification of the surface of liposomes based on lipotripeptides by neoglycoconjugates leads to a decrease in cytotoxicity and increases the ability to transport nucleic acids to hepatocytes.

**Key words:** liposomes, selective delivery, hepatocytes

**Introduction.** Design of products for gene therapy is a highly developing direction of research [1, 2]. The main problem preventing the introduction of these drugs into medical practice is the difficulty in delivering nucleic acids to the target cells. To overcome this problem, various carriers, including liposomes [3], are used. The surface of liposomal nanoparticles can be modified to increase the selectivity. It was found that asialoglycoprotein receptors

on the surface of hepatocytes are able to bind to glycoproteins. The aim of this work was to study the effect of modification of the liposome surface on the selectivity of intracellular transport of nucleic acids in the liver cells.

**Methods.** Liposomes based on OrnOrnGlu(C16)<sub>2</sub> were chosen previously as the effective nucleic acid delivery system. We modified liposomes with neutral carbohydrates - lactose derivatives. One of four neoglycoconjugates was added to OrnOrnGlu(C16)<sub>2</sub> in an amount of 5, 10 and 15%. As a result, 12 variants of modified liposomes were obtained [4]. To determine the cytotoxicity, a MTT test was used. Using luciferase test, the selectivity of penetration was evaluated on 293T (human embryonic kidney) and HepG2 (human liver cells) cell lines.

**Results.** It was found that the modified liposomes of the composition OrnOrnGlu (C16)<sub>2</sub>-4 + LacC16 (5%) and OrnOrnGlu(C16)<sub>2</sub>-4 + LacGGG16 (15%) had the lowest cytotoxicity comparable to that of unmodified OrnOrnGlu(C16)<sub>2</sub>. The IC<sub>50</sub>, established in the MTT test, was 0.14 and 0.26, vs. 0.16 mg/ml. Experiments on the culture of 293T cells showed that OrnOrnGlu(C16)<sub>2</sub>-4 + LacGGG16 (15%) exhibited a 1.5-fold increase in transfection activity compared to unmodified OrnOrnGlu(C16)<sub>2</sub>, whereas the modification of OrnOrnGlu(C16)<sub>2</sub>-4 + Lac C16 (5%) results in a 6-fold decrease in transfection activity. However, the ability of these variants to penetrate the liver cells of HepG2 was higher by 15 and 25 times, respectively, than for unmodified OrnOrnGlu(C16)<sub>2</sub>.

**Conclusion.** The neo-glycoconjugate modification of the surface of liposomes based on lipotriptides was carried out. Two variants of modification were selected, leading to a significant decrease in cytotoxicity and an increase in the ability to transport nucleic acids to hepatocytes. The proposed liposome modification approach is promising in the development of new methods for treating liver diseases. The work was supported by the RFBR grant No. 17-04-01080.

#### References.

1. Khaitov M.R., Litvin L.S., Shilovskiy I.P. et al. RNA interference. New approaches to the development of antiviral drugs // *Immunology* - 2010. -V. 31, №. 2 -P. 69-76.
2. Koloskova O.O., Nosova A.S., Ilyukhina A.A. et al. Liposomal delivery of siRNA // *Biopharmaceutical Journal* - 2017. - V. 9, № 5. - P. 3-10.
3. Koloskova O.O., Nosova A.S., Shchelik I.S. et al. Liver-targeted delivery of nucleic acid by liposomes modified with a glycoconjugate // *Mendeleev Commun.* -2017. -№27. P.626-627
4. Shilovskiy I.P., Sundukova M.S., Gaisina A.R. et al. RNA interference - new approach to the treatment of allergic asthma // *Experimental and Clinical Pharmacology* - 2016. -V. 79, № 4. -P. 35-44

УДК 577.114.3, 547.455

## ОЛИГОМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В-ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ФТОРХИНОЛОНОВ С ПРОЛОНГИРОВАННЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ

**Скuredина А.А., Кудряшова Е.В.**

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия  
 119296, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 3  
 e-mail: skuredinanna@gmail.com

Для создания системы доставки моксифлоксацина с пролонгированным высвобождением предложен подход основанный на формировании комплексов включения «гость-хозяин» с использованием производных β-циклодекстрина. Разработана методика получения олигомеров на основе производных β-циклодекстрина, установлена их структура методом ИК-спектроскопии Фурье. Получены константы диссоциации комплексов олигомеров с моксифлоксацином. Показано, что связывание моксифлоксацина в олигомерах в 20 раз более эффективнее по сравнению с мономерами. Наночастицы представляются перспективными для использования в качестве систем доставки лекарственных препаратов с пролонгированным высвобождением.

**Ключевые слова:** наночастицы, фторхинолоны, β-циклодекстрины

Несмотря на прогресс в области разработки новых лекарственных средств, инфекционные заболевания остаются одной из наиболее острых проблем медицины в мире. Для увеличения эффективности терапии, снижения вероятности возникновения побочных эффектов и снижения дозировки необходимо создание высокоэффективной системы доставки с пролонгированным высвобождением лекарства. В качестве решения поставленной задачи предлагается использование олигомерных наночастиц на основе производных β-циклодекстрина, которые известны своей способностью увеличивать растворимость и

биоактивность лекарственных молекул, и, кроме того, одобрены FDA и активно используются в фармацевтической промышленности [1].

Разработана методика получения олигомеров, основанная на сшивании  $\beta$ -циклодекстринов органическим линкером гексаметилендиизоцианатом. В зависимости от мольного избытка сшивающего агента наблюдается образование различных олигосахаридных структур, исследованные методом ИК-спектроскопии Фурье. Установлены размеры частиц 100 – 200 нм методом NTA и дзета-потенциалы поверхности наночастиц.

Исследование структурных и функциональных свойств полученных наночастиц в качестве систем доставки лекарственных препаратов разрабатывали на примере моксифлоксацина (МФ). МФ - антибактериальный препарат широко используется для лечения внутрибрюшных, офтальмологических, гинекологических, инфекций, а также таких тяжелых заболеваний дыхательных путей, как туберкулез [2].

Рассчитанные значения констант диссоциации комплексов моксифлоксацина с олигомерами  $\beta$ -циклодекстрина составляют порядка  $10^{-6}$  М, что является в 20 раз более эффективнее, чем комплексообразование с мономерами. По-видимому, данный эффект достигается за счет дополнительной стабилизацией комплекса за счет стерического удерживания фторхинолона в порах наночастиц разветвленного олигомера. Методом равновесного диализа, установлено, что комплексообразование моксифлоксацина с олигомерами значительно замедляет высвобождение фторхинолона.

Свойства полученных частиц производных  $\beta$ -циклодекстрина открывают перспективы их применения в качестве систем доставки лекарственных препаратов с пролонгированным действием с регулируемой скоростью высвобождения лекарственного соединения.

*Литература:*

1. Kurkov S.V., Loftsson T. Cyclodextrins // *Int. J. Pharm.* 2013. Vol. 453. P. 167-180.
2. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. Vol. 43. № 5. P. 487-501.

UDC 577.114.3, 547.455

## **OLIGOMERIC NANOPARTICLES OF B-CYCLODEXTRINES AS PERSPECTIVE SYSTEMS OF DELIVERY SYSTEMS OF FLUROCHINOLONES WITH SUSTAINED RELEASE**

**Skuredina A.A, Kudryashova E.V.**

*Lomonosov Moscow State University, Chemical department, Moscow, Russia  
119296, Moscow, Leninskie Gory, 1/3  
e-mail: skuredinanna@gmail.com*

To create a delivery system for moxifloxacin with sustained release, an approach based on the formation of «guest-host» inclusion complexes using  $\beta$ -cyclodextrin derivatives is proposed. A procedure for the preparation of oligomers based on  $\beta$ -cyclodextrin derivatives was developed, and their structure was determined by the method of Fourier IR spectroscopy. The dissociation constants of oligomer complexes with moxifloxacin were obtained. It was shown that the binding of moxifloxacin in oligomers is 20 times more effective than monomers. Nanoparticles seem promising to be used as delivery systems with prolonged release.

Keywords: nanoparticles, fluoroquinolones,  $\beta$ -cyclodextrins

Despite the progress in developing new medical drugs, infectious diseases still remain one of the most serious problem of medicine in the world. To increase the efficiency of therapy, reduce the probability of side effects and decrease the dosage, it is necessary to create a highly effective delivery system with prolonged release of the drug. As a solution to the problem, it is proposed to use oligomeric nanoparticles based on  $\beta$ -cyclodextrin derivatives that are known for their ability to increase the solubility and bioactivity of drug molecules, and are also approved by FDA and are widely used in the pharmaceutical industry.

A procedure for the preparation of oligomers based on crosslinking of  $\beta$ -cyclodextrins with an organic linker with hexamethylene diisocyanate was developed. Depending on the molar excess of the cross-linking agent, various oligosaccharide structures were obtained and observed by the Fourier IR spectroscopy method. The particle sizes of 100-200 nm were determined by the NTA method and the zeta potentials of the nanoparticle surface were examined.

Investigation of the structural and functional properties of obtained nanoparticles as drug delivery systems



were observed using moxifloxacin (MF) as a «guest» molecule. MF - antibacterial drug is widely used for the treatment of intraabdominal, ophthalmic, gynecological, infections, as well as such severe respiratory diseases as tuberculosis.

The values of dissociation constants of moxifloxacin complexes with  $\beta$ -cyclodextrin oligomers were calculated on the order of  $10^{-6}$  M, which is 20 times more effective than complexation with monomers. Apparently, this effect is achieved due to the additional stabilization of the complex due to the steric retention of fluoroquinolone in the pores of the nanoparticles of the branched oligomer. By the method of equilibrium dialysis, it has been established that the complexation of moxifloxacin with oligomers significantly slows the release of fluoroquinolone.

The properties of the obtained nanoparticles of  $\beta$ -cyclodextrin derivatives open the prospects for their use as delivery systems for drugs with controlled sustained release rate of the drug compound.

#### References:

1. Kurkov S.V., Loftsson T. Cyclodextrins // *Int. J. Pharm.* 2013. Vol. 453. P. 167-180.
2. Le-Deygen I.M., Skuredina A.A., Kudryashova E.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. Vol. 43. № 5. P. 487-501.

УДК 615.4

## НАНОЭМУЛЬСИИ КАК ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ

Угланова С.В. <sup>1</sup>, Привалова А.М. <sup>2</sup>, Марквичева Е.А. <sup>3</sup>, Зайцева Е.А. <sup>1</sup>, Головин, Ю.И. <sup>1,4</sup>, Клячко Н.Л. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. академиком М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Наносервис, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва

119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

e-mail: suglanova@gmail.com

Стабилизированную наноэмульсию типа масло в воде (м/в) предложено использовать в качестве носителя для высоко гидрофобного противоопухолевого препарата доцетаксела из класса таксанов. Стабильность и цитотоксичность полученной системы исследовали *in vitro* на клетках рака молочной железы MCF-7. На модели солидной опухоли показано увеличение эффективности действия доцетаксела в форме наноэмульсии по сравнению с коммерческим препаратом.

**Ключевые слова:** наночастицы, наноэмульсии, таксаны, доцетаксел

В настоящее время липосомальные лекарственные препараты приобретают большую популярность в фармацевтической промышленности для лечения онкологических заболеваний. Однако они с трудом проникают в ткани с плотными контактами эпителия, а увеличение соотношения лекарство/липид уменьшает стабильность липосом в водной среде.

Удерживание в липосомах высоко гидрофобных веществ, таксанов, играющих важную роль в лечении солидных опухолей и проявляющих значительную активность в отношении раковых заболеваний, таких как немелкоклеточный рак легкого и рак молочной железы, проблематично.

Для увеличения гидрофобной емкости стерически стабилизированных мицелл уже применялись фосфолипиды, яичный фосфатидилхолин, холестерол и витамин Е, но на пациентах с солидными опухолями преимуществ по сравнению с уже применяемым в клинике препаратом такая система не показала [1]. Чтобы объединить преимущества липидных и полимерных мицелл, для которых наиболее широко распространены поли(альфа-гидроксиэфиры) в составе (такие как PDLLA, PGA, PCL), разрабатываются новые стерически стабилизированные мицеллярные системы. Наноэмульсии представляют собой композиции состава вода/масло/сурфактант, сферические капли нано-размеров которой диспергированы в дисперсионной фазе в неравновесном состоянии и, обычно, формируются с использованием высокоэнергетических методов (УЗ, гомогенизация высокого давления).

Задачей настоящей работы стал подбор состава и создание методики получения наноэмульсии для включения антинеопластика из класса таксанов с ультранизкой водорастворимостью, доцетаксела. Цитостатическую эффективность доцетаксел-содержащей наноэмульсии проверяли и на монослое клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, и на клеточной модели солидной опухоли - мультিকлеточных опухолевых сфероидов (МОС) [2]. Анализ остаточного количества живых клеток произ-

водился после инкубирования клеток в питательной среде ДМЕМ, содержащей доцетаксел в созданной наноземulsionии и коммерческого препарата Taxotere. При длительном экспонировании, как и ожидалось, выживаемость клеток в монослое была ниже, чем в сфероидах. Для монослоя процент выживших клеток через 48 ч при концентрации доцетаксела 20, 300 и 1000 нМ составил 25, 18 и 12% соответственно. Выживаемость в мультиклеточных опухолевых сфероидах (МОС) была на 5-7% выше в тех же условиях. Доцетаксел в форме наноземulsionии показал эффективность выше, чем в традиционно используемом препарате Taxotere.

Полученные результаты позволили сделать вывод, что липидная наноземulsionия может быть использована в качестве устойчивой к быстрой деградации системы доставки противоракового препарата доцетаксела для терапии солидных опухолей.

*Литература:*

1. Soepenbergh O., Sparreboom A., de Jonge M. J., Planting S. Th., de Heus G, Loos W. J., Hartman C. M., Bowden C., Verweij J. Real-time pharmacokinetics guiding clinical decisions: phase I study of a weekly schedule of liposome encapsulated paclitaxel in patients with solid tumours// *European Journal of Cancer*. – 2004. - 40. - P. 681 – 688
2. D. S. Zaytseva-Zotova, O. O. Udartseva, E. R. Andreeva, A. Bartkowiak, L.N. Bezdetnaya, F. Guillemin, J.-L. Goergen, and E. A. Markvicheva. Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool to study the effects of photodynamic therapy// *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2011. - 97(2). - P. 255 – 262

UDC 615.4

## NANOEMULSIONS AS PLATFORM FOR INTRACELLULAR DRUG DELIVERY

Uglanova S.V. <sup>1</sup>, Privalova A.M. <sup>2</sup>, Markvicheva E.A. <sup>3</sup>, Zaitseva E.A. <sup>1</sup>, Golovin U.I. <sup>1,4</sup>, Klyachko N.L. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

<sup>3</sup> M.M. Shemyakin–Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

<sup>4</sup> G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Leninskie Gory, 1/3, Moscow, Russia

e-mail: suglanova@gmail.com

Stabilized nanoemulsion oil-in-water type (o/w) for highly hydrophobic docetaxel (class taxanes) solubilization was investigated. Stability and in vitro study of cytotoxicity was carried out in 2 models, namely using 3D in vitro model based on multicellular tumor spheroids (MTS) and 2D monolayer culture MCF-7 for our system - nanoemulsion and for commercial drug form.

**Key words:** nanoparticles, liposomes, nanoemulsions, taxanes, doxetaxel

Liposomes are the popular drug form in pharm industry for medical oncologic therapy. But they are known to be not so good for solid tissues penetration and drug/lipid ratio rising causes low stability. Retaining of hydrophobic substances like paclitaxel and docetaxel, which are well known for their antineoplastic efficacy against non-small-cell lung cancer and breast cancer, becomes a problem for lipid emulsions. Egg phosphatidylcholine, cholesterol, tocopherol for emulsification were used to increase hydrophobic capacity, but it wasn't doing better than commercial composition on solid tumors [1]. To use advantages both of lipid and polymeric micelles (common use of poly alpha-hydroxy ethers like PDLLA, PGA, PCL) new sterically-stabilized micelle systems are still under development.

Nanoemulsion is a composition of the water/oil/surfactant, which is spherical nano-sized droplets dispersed in a continuous phase is in a non-equilibrium state and is generally formulated through the "high-energy" methods, such as high-pressure homogenization, ultrasonication.

In the current study, stabilized emulsions of oil-in-water type (o/w) with nano-scale particle size were used as containers for docetaxel. To study cytotoxicity of nanoemulsion, the obtained multicellular tumor spheroids (MTS) [2] as well as monolayer culture MCF- 7 were incubated in DMEM medium in the presence of docetaxel-loaded nanoemulsion and commercial Taxotere.

In vitro study of the cytotoxicity of docetaxel-loaded nanoemulsion during the exposure of tumor cells demonstrated lower viability of the cells in 2D monolayer culture compared to that for cells in MTS as it was expected. In the monolayer culture the numbers of viable cells were 25, 18 and 12% for samples containing 20, 300 and 1000 нМ docetaxel in nanoemulsion respectively after 48h. For MTS these values were higher at approximately 5-7% for these concentrations. Docetaxel-loaded nanoemulsion demonstrates higher efficacy than commercial drug form Taxotere.

The results obtained demonstrate our system to be resistant to degradation carrier for hydrophobic drugs for solid tumor therapy.

## References:

1. Soepenbergh O., Sparreboom A., de Jonge M. J., Planting S. Th., de Heus G, Loos W. J., Hartman C. M., Bowden C., Verweij J. Real-time pharmacokinetics guiding clinical decisions: phase I study of a weekly schedule of liposome encapsulated paclitaxel in patients with solid tumours// *European Journal of Cancer*. – 2004. - 40. - P. 681 – 688
2. D. S. Zaytseva-Zotova, O. O. Udartseva, E. R. Andreeva, A. Bartkowiak, L.N. Bezdetnaya, F. Guillemin, J.-L. Goergen, and E. A. Markvicheva. Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool to study the effects of photodynamic therapy// *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2011. - 97(2). - P. 255 – 262

УДК 615.451.232

## НОВЫЕ БИВАЛЕНТНЫЕ КЕРАСОМООБРАЗУЮЩИЕ ЛИПИДЫ, В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Миронова М.С., Кондря У.Р., Буданова У. А., Себякин Ю.Л.

Московский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия  
 119571, Москва, просп. Вернадского, 86.  
 e-mail: c-221@yandex.ru

Предложена схема и осуществлён синтез новых керасомообразующих липидов (КОЛ) с разветвляющим звеном на две антенны при использовании производных L-орнитина и L-аспарагиновой кислоты. Сформированные керасомы оставались стабильными более 90 дней.

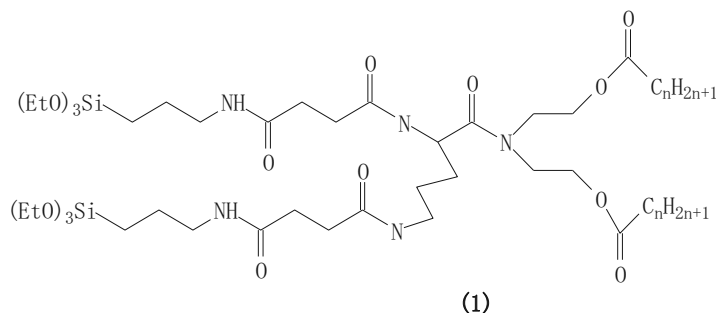
**Ключевые слова:** керасомы, керасомообразующие липиды, транспортные системы, липоаминокислоты.

На сегодняшний день одним из активно развивающихся направлений фармацевтики является создание новых систем доставки лекарственных препаратов. Несмотря на существенные достоинства применения многих видов транспортных систем доставки, активно разрабатывается модель транспортной системы на основе гибридных кремнийорганических материалов.

Керасомы - транспортные системы, представляющие собой орго-неорго-анесическне наноразмерные частицы с двухслойной везикулярной структурой и полиорганосилоксановой сетью на поверхности [1]. Керасомы могут быть загружены гидрофильными, гидрофобными и амфифильными молекулами лекарственных средств с контролируемым высвобождением [2]. Основным компонентом этих гибридных носителей являются, так называемые, керасомообразующие липиды (КОЛ). На данный момент представлено и описано разнообразие структур КОЛ, различающихся полярным, гидрофобным фрагментами и линкером между ними.

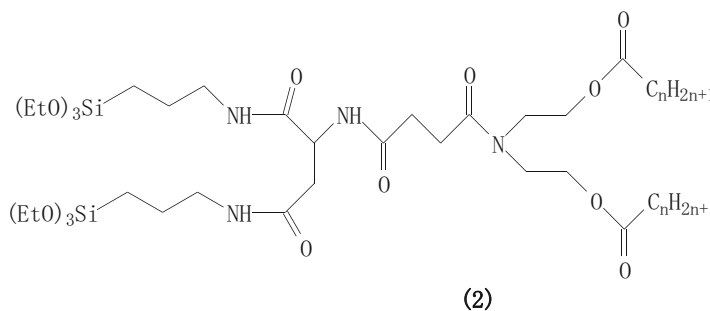
Целью работы является получение новых КОЛ с двумя остатками 3-аминопропилтриэтоксисилана в гидрофильном блоке, различающихся структурой линкера и изучение их мембранообразующих свойств.

В первом случае (1) в качестве разветвляющего на две карбоксильные группы агента использовалось производное L-орнитина.



Содержание двух остатков триэтоксисилана в новых синтезированных КОЛ увеличивает вероятность сшивки кремниевых головок, и, как следствие, приводит к формированию более прочной силоксановой сети на поверхности керасом.

Другая модификация соединительного звена была достигнута с помощью L-аспарагиновой кислоты (2).



При формировании керасомальных дисперсий наилучшие результаты были получены с использованием метода гидратации тонкой плёнки.

Для определения стабильности определяли изменение оптической плотности приготовленных образцов при прохождении через них световой волны длиной 400 нм. Полученные дисперсии оставались стабильными на протяжении 90 дней.

Таким образом, полученные керасомы могут служить в качестве эффективных носителей лекарственных средств с контролируемым высвобождением.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант РФФИ №16-04-01010.

*Литература:*

1 Kikuchi J., Yasuhara K. Cerasomes. A new family of artificial cell membranes with ceramic surface. // *J. Advances in Biomimetics*. - 2011. - P. 231-50.

2 Cao Z., Ma Y., Yue X.L., Li S., Dai Z.F., Kikuchi J. Stabilized liposomal nanohybrid cerasomes for drug delivery applications // *RSC Adv*. - 2016. - P. 16292.

UDC 615.451.232

## NEW BIVALENT CERASOME-FORMING LIPIDES, AS COMPONENTS OF DELIVERY SYSTEMS OF ANTITUMOR PREPARATIONS

**Mironova M.S., Kondrya U.R., Denieva Z.G., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L.**

Moscow Technological University, M.V. Lomonosov Moscow Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow, Russia 119571, Moscow, prosp. Vernadskogo, 86.  
e-mail: c-221@yandex.ru

A scheme is proposed and synthesis of new cerasome-forming lipids (CFL) with a branching link into two antennas is made using L-ornithine and L-aspartic acid derivatives. Formed cerasomes remained stable for more than 90 days.

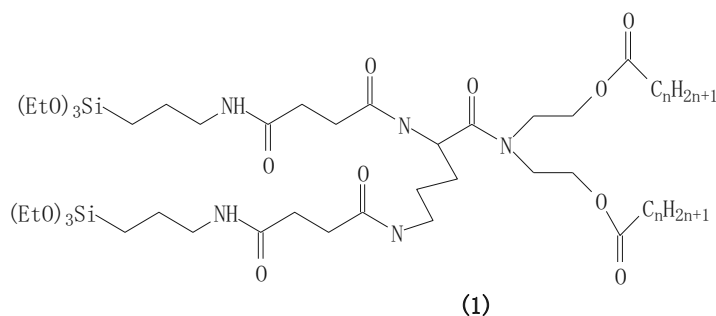
**Key words:** cerasome, cerasome-forming lipids, transport systems, lipoaminoacid.

Nowadays, one of the actively developing areas of pharmaceuticals is the creation of new drug delivery systems. Despite the significant advantages of using many types of transport delivery systems, a model of a transport system based on hybrid silicone materials is being actively developed.

Cerasomes are transport systems that are organic-inorganic nanoscale particles with a bilayered vesicular structure and a polyorganosiloxane network on the surface [1]. Cerasome can be loaded with hydrophilic, hydrophobic or amphiphilic drug molecules and exhibit sophisticated controlled release behavior [2]. The main component of these hybrid carriers are, so-called, cerasome-forming lipids (CFL). At the moment, a variety of CFL structures differing in polar, hydrophobic fragments and a linker between them is presented and described.

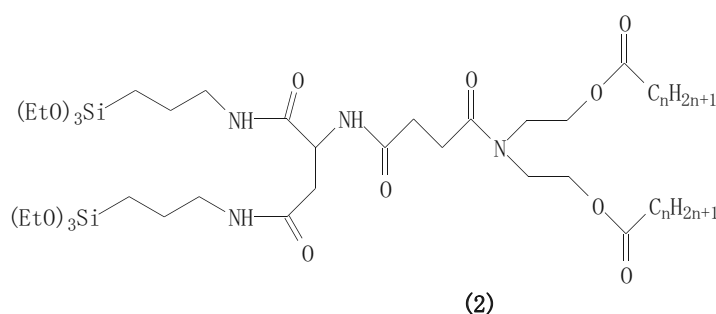
The aim of the work is to obtain new CFL with two residues of 3-aminopropyltriethoxysilane in a hydrophilic block, which differ in the structure of the linker and study their membrane-forming properties.

In the first case (1), a L-ornithine derivative was used as a branching agent for two carboxyl groups.



The content of two residues of triethoxysilane in the new synthesized CFL increases the probability of cross-linking of silicon heads, and, as a result, leads to the formation of a stronger siloxane network on the surface with cerasome.

Another modification (2) of the link was achieved with L-aspartic acid..



In the formation dispersions of cerasome the best results were obtained using the thin film hydration method.

To determine the stability, the change in the optical density of the prepared samples was determined when a light wave with a length of 400 nm passed through them. The resulting dispersions remained stable for 90 days. Thus, the resulting cerasomes can serve as effective carriers of controlled-release drugs.

The work is supported by the Russian Foundation for Basic Research, the RFBR grant №16-04-01010.

#### References:

- 1 Kikuchi J., Yasuhara K. Cerasomes. A new family of artificial cell membranes with ceramic surface. // *J. Advances in Biomimetics*. - 2011. - P. 231-50.
- 2 Cao Z., Ma Y., Yue X.L., Li S., Dai Z.F., Kikuchi J. Stabilized liposomal nanohybrid cerasomes for drug delivery applications // *RSC Adv*. - 2016. - P. 16292.

УДК 547.415.1

## НОВЫЕ ГУАНИДИНИЛИРОВАННЫЕ АМФИФИЛЫ В КАЧЕСТВЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ ДОСТАВКИ БАВ И ИХ ВИЗУАЛИЗАЦИИ В КЛЕТКЕ

Лосева А. А., Буданова У.А., Себякин Ю. Л.

Московский технологический университет (институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова),  
 Москва, Россия  
 119571, Москва, пр-т Вернадского 86.  
 e-mail: c-221@yandex.ru

Синтезирован новый катионный амфифил с гуанидиновой головной группой на основе липоаминокислот и диаминов для создания систем доставки лекарственных веществ и генетического материала, а также его пиреновое производное для визуализации транспорта формируемых липосом в различных типах клеток.

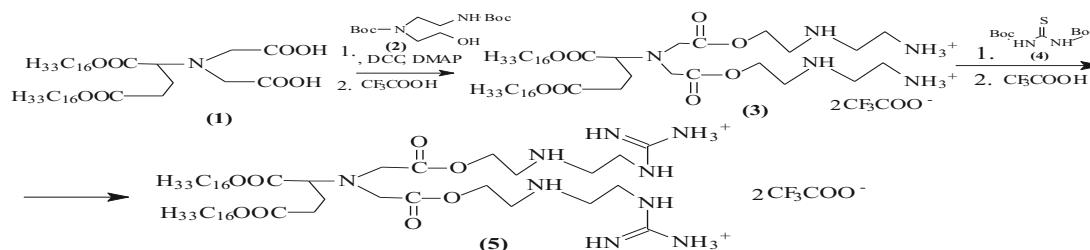
**Ключевые слова:** катионный амфифил; гуанидины; диамины; пирен; транспортные системы БАВ.

Перспективным направлением в поисках систем доставки БАВ является разработка катионных амфифилов с гуанидинилированными головными группами [1,2]. С целью детального понимания процесса вклю-

чения в клетку формируемых на их основе липосом синтезирован катионный амфифил (5) с гуанидиновой головной группой, а также его пиреновое производное (11).

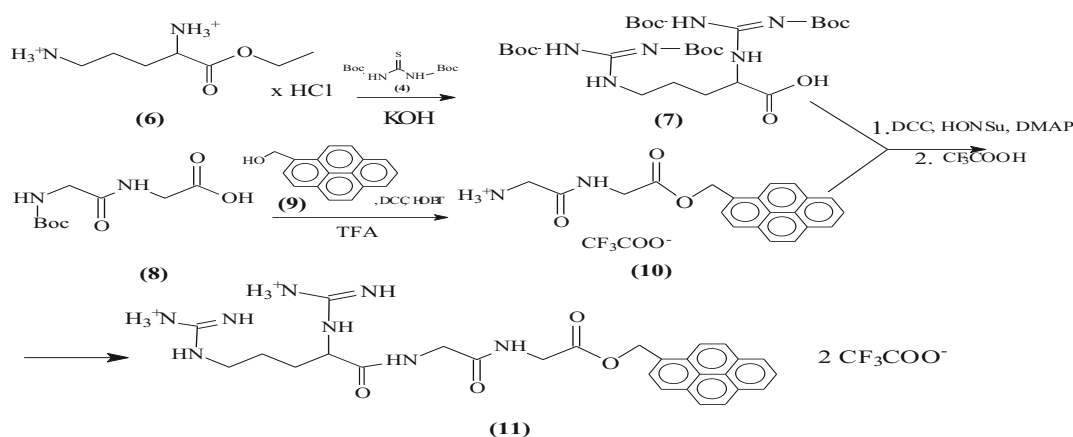
Разработанная схема синтеза (схема 1) включает получение гидрофобного блока в виде диэфира глутаминовой кислоты, разветвление на две свободные карбоксильные группы по реакции с монохлоруксусной кислотой, реакцию с ди-Вос-аминоэтилэтаноламином (2) и заключительное гуанидирование аминов действием ди-Вос-тиомочевины (4) [3]. Структура полученного соединения подтверждалась данными ЯМР-, ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Схема 1.



Синтез нового пиренового флуорофора основан на реакции гуанидинилированного производного L-Orn (7) и Gly-Gly-эфира пиренметанола (10) [4] (схема 2). Структура полученного соединения подтверждалась данными масс-спектрометрии.

Схема 2.



Анализ литературных данных [5,6] и предварительные исследования свидетельствуют о перспективности новых систем доставки БАВ, а включение пиренового производного будет способствовать более глубокому пониманию внутриклеточного действия агрегатов в клетке.

Работа поддержана грантом РФФИ №17-04-01141.

Литература:

- 1 Sen J., Chaudhuri A. Design, syntheses, and transfection biology of novel non-cholesterol-based guanidinylated cationic lipids // *J of Med Chem*. 2005. Vol.48 №3. P.812-820.
- 2 Wexselblatt E., Esko J., Tor Y. On guanidinium and cellular uptake // *J Org Chem*. 2014. Vol.79. №15. P.6766-6774.
- 3 Exposito A., et al. Total synthesis and absolute configuration of minalemine A, a guanidine peptide from the marine tunicate *Didemnum rodriguesi* // *J Org Chem*. 2001. Vol.66 P.4206-4213.
- 4 Xiao-Xiang Z., et al. Lipid-mediated DNA and siRNA transfection efficiency depends on peptide headgroup // *Soft Matter*. 2013. Vol.9, P.4472-4479.
- 5 Harrington D., et al. Supramolecular Fluorophores for Biological Studies: Phenylene Vinylene-Amino Acid Amphiphiles // *CHEM BIOL*. 2005. Vol.12 №10. P.1085-1091.
- 6 Leal C., et al. Incorporating Multivalent Lipids: Enhanced Membrane Charge and Pore Forming Ability for Gene Silencing // *Langmuir*. 2011. Vol.27 №12. P.7691-7697.

UDC 547.415.1

## NEW GUANIDINYLATED AMPHIFILES AS HIGH EFFECTIVE AGENTS FOR DELIVERY BAS AND THEIR VISUALIZATION IN THE CELL

Loseva A. A., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L.

Moscow Technological University (M.V. Lomonosov Moscow Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, Russia  
 119571, Moscow, prosp. Vernadskogo 86.  
 e-mail: c-221@yandex.ru

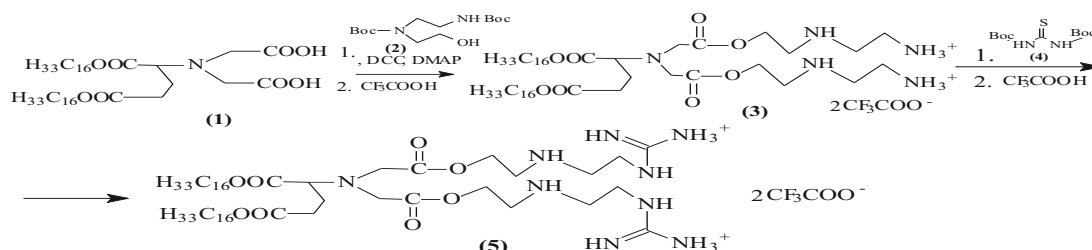
A new cationic amphiphile with a guanidine head group based on lipoamino acids and diamines for the development of drug delivery systems and genetic material, and its pyrene derivative for visualizing the transport of formed liposomes in various types of cell has been synthesized.

**Key words:** cationic amphiphile; guanidines; diamines; pyrene; BAS transport systems.

A promising direction in the search for BAS delivery systems is the development of cationic amphiphiles with guanidinylated head groups [1,2]. To understand the process of including in the cell liposomes formed on the basis of it in detail, a cationic amphiphile (5) with a guanidine head group, as well as its pyrene derivative (11) was synthesized.

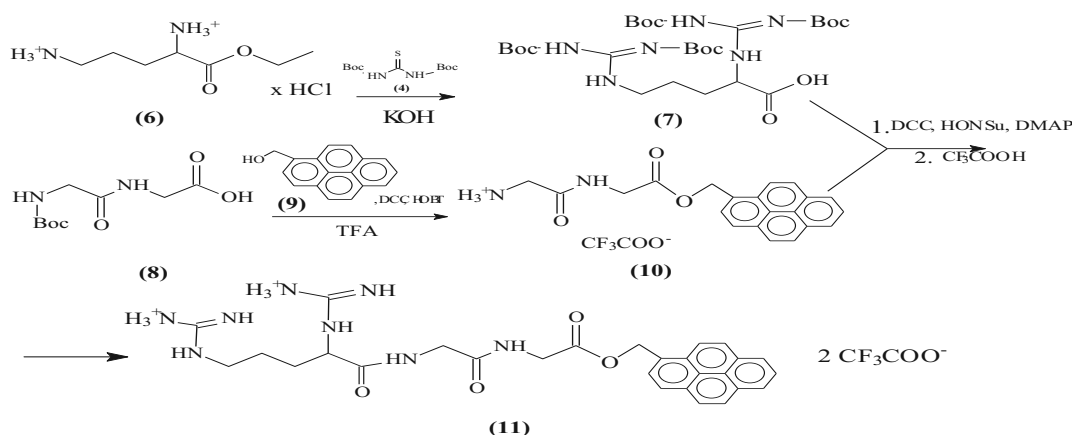
The developed synthesis scheme (scheme 1) includes the preparation of a hydrophobic block in the form of a diester of glutamic acid, branching into two free carboxyl groups by reaction with monochloroacetic acid, a reaction with di-Boc-aminoethylethanolamine (2) and the final guanidination of amines by the action of di-Boc-thiourea (4) [3]. The structure of compounds obtained was confirmed by means of NMR-, IR-spectroscopy and mass-spectrometry.

Scheme 1.



The synthesis of the new pyrene fluorophore is based on the reaction of the guanidinylated derivative of L-Orn (7) and the Gly-Gly-ester of pyrenemethanol (10) [4] (scheme 2). The structure of compound obtained was confirmed by means of mass-spectrometry.

Scheme 2.



An analysis of literature [5,6] and preliminary studies indicate the promise of new delivery systems for BAS, and the inclusion of the pyrene derivative will contribute to a deeper understanding of the intracellular action of aggregates in the cell.

The work is supported by RFBR grant №17-04-01141.

References:

- 1 Sen J., Chaudhuri A. Design, syntheses, and transfection biology of novel non-cholesterol-based guanidylated cationic lipids // *J of Med Chem*. 2005. Vol.48 №3. P.812-820.
- 2 Wexselblatt E., Esko J., Tor Y. On guanidinium and cellular uptake // *J Org Chem*. 2014. Vol.79. №15. P.6766–6774.
- 3 Exposito A., et al. Total synthesis and absolute configuration of minalemine A, a guanidine peptide from the marine tunicate *Didemnum rodriguesi* // *J Org Chem*. 2001. Vol.66 P.4206–4213.
- 4 Xiao-Xiang Z., et al. Lipid-mediated DNA and siRNA transfection efficiency depends on peptide headgroup // *Soft Matter*. 2013. Vol.9, P.4472-4479.
- 5 Harrington D., et al. Supramolecular Fluorophores for Biological Studies: Phenylene Vinylene-Amino Acid Amphiphiles // *CHEM BIOL*. 2005. Vol.12 №10. P.1085–1091.
- 6 Leal C., et al. Incorporating Multivalent Lipids: Enhanced Membrane Charge and Pore Forming Ability for Gene Silencing // *Langmuir*. 2011. Vol.27 №12. P.7691-7697.

УДК 577.15

## ОДНОДОМЕННЫЕ МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК МЕДИАТОРЫ ЛОКАЛЬНЫХ ДЕФОРМАЦИЙ МАКРОМОЛЕКУЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА ИХ ПОВЕРХНОСТИ

Веселов М.М.<sup>1</sup>, Леонтьев С.А.<sup>1</sup>, Ефремова, М.В.<sup>1,2</sup>, Упоров И.В.<sup>1</sup>, Мажуга А.Г.<sup>3,2,1</sup>, Кабанов А.В.<sup>1,4</sup>, Головин Ю.И.<sup>1,5</sup>, Клячко Н.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Лаборатория химического дизайна бионаноматериалов, химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1-11Б, Россия

<sup>2</sup> Национальный технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

<sup>3</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

<sup>4</sup> University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

<sup>5</sup> Наноцентр, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия  
e-mail: veselov.mac@gmail.com

Изучен механизм изменения каталитической активности  $\alpha$ -химотрипсина, иммобилизованного на однодоменных наночастицах  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  типа ядро@оболочка под воздействием переменного магнитного поля частотой 50 Гц. Показано, что падение ферментативной активности обусловлено изменениями в структуре сорбционного центра, вызванными вращательно-колебательными или поступательно-колебательными движениями магнитных наночастиц (МНЧ).

**Ключевые слова:** магнитные наночастицы, низкочастотное магнитное поле, Брауновская релаксация, иммобилизованные ферменты

В последние десятилетия наблюдается значительный рост количества публикаций, связанных с применением магнитных наночастиц для наномедицины и биотехнологии. В связи с этим ранее нами был теоретически обоснован «наномеханический» подход [1] к управлению биохимическими реакциями на поверхности однодоменных МНЧ в низкочастотном магнитном поле. В данном подходе суперпарамагнитные наночастицы используются в качестве медиаторов локальных деформаций прикрепленных к ним биомолекул. Нами синтезированы биоконъюгаты карбоксилированных и аминированных магнитных наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  типа ядро@оболочка, шитые молекулами  $\alpha$ -химотрипсина. В результате действия переменного магнитного поля (ПМП) частотой 50 Гц и интенсивностью 0,14 Тл нами наблюдалось значительное снижение ферментативной активности, вызванное уменьшением размеров сорбционного центра фермента. Полученные данные подтверждены результатами молекулярного моделирования и кинетического анализа.

Работы выполнены при финансовой поддержке грантов РФФИ 14-13-00731 и РФФИ 17-54-33027 с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

Literatura:

1. Головин Ю.И. и др. Однодоменные магнитные наночастицы в переменном магнитном поле как медиаторы локальной деформации окружающих макромолекул // *Физикатвердотела*. – 2014. - №56. – С. 1292-1300



UDC 577.15

## SINGLE-DOMAIN MAGNETIC NANOPARTICLES AS MEDIATORS OF LOCAL DEFORMATIONS OF IMMOBILIZED ON ITS SURFACE MACROMOLECULES

Veselov M.M.<sup>1</sup>, Leontyev S.A.<sup>1</sup>, Efremova M.V.<sup>1,2</sup>, Uporov I.V.<sup>1</sup>, Majouga A.G.<sup>3,2,1</sup>, Kabanov A.V.<sup>1,4</sup>, Golovin Yu.I.<sup>1,5</sup>, Klyachko N.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Leninskie Gory, 1-11B, Russia

<sup>2</sup> National University of Science and Technology "MISIS" (MISIS), Moscow, Russia

<sup>3</sup> D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

<sup>4</sup> University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

<sup>5</sup> G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

e-mail: veselov.mac@gmail.com

The mechanism of  $\alpha$ -chymotrypsin immobilized on single-domain core@shellFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanoparticles activity changes under 50 Hz magnetic field was studied. As shown, the catalytic activity dropped down due to the changes occurred in the structure of the enzyme binding site caused by the mechanical rotational vibrational or translational vibrational motions of nanoparticles.

Keywords: magnetic nanoparticles, low-frequency magnetic field, Brownian relaxation, immobilized enzymes

Recently, there has been a significant increase in publications related to the application of magnetic nanoparticles (MNPs) for nanomedicine and biotechnology. In connection with this, we previously theoretically demonstrated the "nanomechanical" approach [1] to the control of biochemical reactions on the surfaces of single-domain MNPs in a low-frequency magnetic field. In this approach, superparamagnetic nanoparticles are used as mediators of local deformations of biomacromolecules attached to them. We synthesized carboxylated and aminated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au core@shell magnetic nanoparticles that were cross-linked by  $\alpha$ -chymotrypsin molecules. As a result of the action of alternating 50 Hz and 140 mT magnetic field (AMF) we observed a significant decrease in enzymatic activity caused by a decrease of the size of the enzyme binding site. The data obtained are confirmed by the results of molecular modeling and kinetic analysis.

The work was supported in part by RSF-14-13-00731 and RFBR 17-54-33027 grants and M.V. Lomonosov Moscow State University Program of Development.

References:

1. Golovin Yu.I. et. all. Single-domain magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field as mediators of local deformation of the surrounding macromolecules // *Phys. of the Solid State*. 2014. Vol. 56. №7. P. 1342–1351

УДК 577.152.192.31; 547.99

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ ДЕГИДРОКВЕЦЕТИНА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ С УЛУЧШЕННЫМИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

М.Е. Хлупова<sup>1</sup>, И.С. Васильева<sup>1</sup>, Г.П. Шумакович<sup>1</sup>, О.В. Морозова<sup>1</sup>, Е.А. Зайцева<sup>2</sup>, В.А. Чертков<sup>2</sup>, А.К. Шестакова<sup>3</sup>, А.В. Кисин<sup>3</sup>, К.В. Лисицкая<sup>1</sup>, А.И. Ярополов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

119071, Москва, Ленинский проспект, 33;

<sup>2</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

119991, Москва, Ленинские горы, 1/3;

<sup>3</sup> Государственный научно-исследовательский институт химии и технологии элементоорганических соединений, Москва, Россия, 105118, Москва, шоссе Энтузиастов, 38

e-mail: ezaitseva2008@gmail.com

Разработан метод окислительной полимеризации дегидрохверцетина (ДГК) с участием билирубиноксидазы *Murothecium verrucaria* и лакказы базидиального гриба *Trametes hirsuta*. Продукты полимеризации ДГК охарактеризованы методами УФ-видимой, FTIR и ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C спектроскопии. Найдено, что олигомеры ДГК обладают повышенной термостабильностью и антиоксидантной активностью по сравнению с мономером.

**Ключевые слова:** лакказы, билирубиноксидаза, дигидрокверцетин, окислительная полимеризация, антиоксидантная активность

Дигидрокверцетин (таксифолин, ДГК) относится к природным флавоноидам и имеет широкий спектр фармакологического действия: он проявляет антиоксидантные, ангиопротекторные, гепатопротекторные, противоопухолевые и другие свойства, кроме того ДГК обладает регуляторными свойствами и может контролировать репарацию ДНК, апоптоз, митохондриальный биогенез, а также регулировать активность различных ферментов. Однако, многие флавоноиды, включая ДГК, быстро разлагаются в организме, в то время как их относительно высокомолекулярные производные, имеют большее время жизни *in vivo*, что указывает на необходимость поиска новых производных ДГК.

В настоящей работе предложен метод синтеза олигомеров ДГК с участием многоядерных медьсодержащих оксидаз: билирубиноксидазы (БОД) *Myrothecium verrucaria* и лакказы (ЛК) базидиального гриба *Trametes hirsuta*. При выбранных условиях синтезированные олигомеры ДГК были получены с хорошим выходом (более 30%). Продукты окислительной полимеризации ДГК охарактеризованы методами УФ-видимой, FTIR и ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  спектроскопии. В зависимости от используемой оксидазы продукты полимеризации ДГК имели отличающиеся физико-химические характеристики. Найдено различие в структурах олигомеров ДГК, полученных с использованием ЛК и БОД. В результате ЯМР исследований было показано, что олигомеры ДГК, синтезированные с участием БОД, имеют нерегулярную структуру. По сравнению с мономером олигомеры ДГК, синтезированные с использованием обоих ферментов, имели более высокую термостабильность. Антиоксидантную активность определяли как концентрацию олигомеров ДГК или мономера ДГК, необходимую для уменьшения начальной концентрации 1,1'-дифенил-2-пикрилгидразил радикала DPPH• на 50%. Для олигомеров, синтезированных с участием БОД, наблюдали повышение антиоксидантной активности в 2,5 раза по сравнению с исходным мономером.

Для повышения эффективности синтеза олигомеров изучали возможность многократного использования фермента. Показано, что лакказа, включенная в гидрофобную ионную жидкость (1-бутил-2-метилимидазолий гексафторфосфат), может быть многократно использована для биотрансформации ДГК. Физико-химические характеристики олигомеров ДГК, синтезированных с участием иммобилизованного фермента, не отличались от характеристик олигомеров, полученных с нативной лакказой. Сравнительное исследование антиоксидантной активности мономеров и олигомеров ДГК проводили на культуре клеток почки собаки MDCK1. Для детекции свободных радикалов использовали 2'7'-дихлорфлуоресцеин ацетат (ДХФА). Установлено, что олигомеры ДГК обладали более выраженными антиоксидантными свойствами по сравнению с мономером.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 17-04-0037а и № 14-04-00403а.

UDC 577.152.192.31; 547.99

## OXIDATIVE POLYMERIZATION OF DEHYDROQUERCETIN FOR PRODUCTION OF NEW COMPOUNDS WITH IMPROVED PHARMACEUTICAL PROPERTIES

M.E. Khlopova <sup>1</sup>, I.S. Vasil'eva <sup>1</sup>, G.P. Shumakovich <sup>1</sup>, O.V. Morozova <sup>1</sup>, E.A. Zaitseva <sup>2</sup>, V.A. Chertkov <sup>2</sup>, A.K. Shestakova <sup>3</sup>, A.V. Kisin <sup>3</sup>, K.V. Lisitskaya <sup>1</sup> and A.I. Yaropolov <sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology RAS, Leninskii pr. 33, 119071, Moscow, Russia;*

<sup>2</sup> *M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Leninskie Gory 1/3, 119991, Moscow, Russia;*

<sup>3</sup> *State Research Institute of Chemistry and Technology of Organoelement Compounds, Shosse Entuziastov 38, 105118, Moscow, Russia*

*e-mail: ezaitseva2008@gmail.com*

A method for oxidative polymerization of dihydroquercetin (DHQ) has been developed. Bilirubin oxidase from *Myrothecium verrucaria* and laccase from the basidial fungus *Trametes hirsuta* were applied as catalysts. The products of polymerization were analyzed using UV-vis, FTIR,  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. DHQ oligomers synthesized were found to have higher thermostability and higher antioxidative activity as compared with the monomer.

**Key words:** laccase, bilirubin oxidase, dihydroquercetin, oxidative polymerization, antioxidative activity

Dihydroquercetin (taxifolin, DHQ) belongs to natural flavonoids and has a wide range of pharmacological effects, in particular antioxidant, angioprotective, hepatoprotective, antitumor and others. Furthermore, DHQ also

shows regulatory properties and can control DNA repair, apoptosis, and mitochondrial biogenesis, as well as it can regulate the activity of certain enzymes. It is known that many flavonoids including DHQ decompose rather quickly in vivo while their relatively high molecular weight derivatives have a longer lifespan. These data show promise for the synthesis of novel DHQ derivatives.

In this work a new method for dihydroquercetin oxidative polymerization has been proposed. Multicopper oxidases, namely, bilirubin oxidase (BOD) from *Myrothecium verrucaria* and laccase (LC) from the basidial fungus *Trametes hirsuta* are used as catalysts. The conditions selected enabled good yields of DHQ oligomers (more than 30%), which were then analyzed using UV-vis, FTIR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. Depending on the enzyme applied, the products of DHQ polymerization differed in physico-chemical properties, and as shown by NMR studies, had different structures. In particular, the products of BOD-catalyzed DHQ polymerization were found to have an irregular structure. DHQ oligomers synthesized using both enzymes demonstrated higher thermostability as compared with the monomer.

The antioxidant activity of DHQ oligomers and DHQ monomer was defined as the antioxidant concentration which required to decrease the initial concentration of DPPH• (1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl) by 50%. The significant increase of antioxidant activity (2.5 times) was observed for BOD synthesized DHQ oligomers in comparison with antioxidant activity of DHQ monomer.

To improve the efficiency of biocatalytic synthesis the possibility of enzyme reuse was studied. It was shown that laccase included into hydrophobic ionic liquid (1-butyl-2-methylimidazolium hexafluorophosphate) can be reused for biotransformation of dihydroquercetin. The physico-chemical characteristics of DHQ oligomers synthesized using immobilized into the ionic liquid laccase (LC/IL) did not differ from the characteristics of the oligomers obtained with native laccase. Comparative study of antioxidant activity of DHQ monomer and DHQ oligomers was conducted on dog kidney cell culture (MDCK 1). 2',7'-dihlorofluorescein diacetate (DHFD) was applied to detect free radicals. It was found that the DHQ oligomers obtained by enzymatic synthesis with immobilized into IL laccase possess more pronounced antioxidant properties as compared with the monomer.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects No. 17-04-00378a and No. 14-04-00403a.

УДК: 604, ББК: 52.5

## ПЕРСНИФИЦИРОВАННЫЙ БИОПЛАСТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ РАСТВОРИМОЙ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ.

И.Р. Гильмутдинова <sup>1</sup>, П.С. Еремин <sup>1</sup>, Н.В. Меньшутина <sup>3</sup>, Д.Д. Ловская <sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Международный учебно-научный центр трансфера фармацевтических и биотехнологий Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева, Россия, 125047, Москва, Миусская площадь, 9, chemcom@muctr.ru,

Разработана оригинальная технология получения персонифицированного биопластического материала на основе растворимой формы стабилизированного внеклеточного матрикса (ВМ). В качестве исходных компонентов используются коллаген I типа, гиалуроновая кислота и эластин в соотношениях, равных соотношения в дерме взрослого человека. В качестве биологически активных компонентов (БАК) мы использовали пептиды размером от 10 до 50 кДа, полученные из аутологичных пролиферативно активных фибробластов.

**Ключевые слова:** персонифицированная медицина, тканеинженерная конструкция, клеточные технологии, коллаген; фибробласты человека; биопластический материал.

Согласно стратегии развития медицинской науки в РФ на период до 2025 года технологии регенеративной медицины, в общем, и биотехнологии, в частности, определены в качестве приоритетных направлений в здравоохранении. В связи с этим в современном здравоохранении интенсивно развивается направление по разработке биоактивных матриц для восстановления утраченных или повреждённых тканевых структур организма человека.

Современный рынок биопластических материалов в основном представлен продуктами децеллюри-

зированной дермы: свиной или донорской человека [1]. Так же широко используются синтетические раневые покрытия, как правило, витализированные аллогенными донорскими клетками. Основным недостатком которых является высокая цена, большой процент побочных нежелательных реакций [2].

Одним из перспективных биоматериалов являются биоматериалы, полученные из ВМ тканей, используемые в комбустиологии, травматологии, пластической хирургии. Такой подход обеспечивает оптимизированное микроокружение для клеток, способствующее росту трехмерной структурированной ткани [3]. А изученные на анатомическом, биохимическом и молекулярном уровнях механизмы органоспецифической гисторегенерации требуют создания биопластических персонифицированных материалов нового поколения с максимально приближенной по фиброархитектонике к тканям или органам комплексной фармакологической системой с заданными фармацевтическими эффектами гисторепаранта [4,5]. По сути, это сложные фармацевтические средства, представленные физиологически активной матрицей и иммобилизованной в неё молекулой с определённым фармацевтическим эффектом.

Целью настоящего исследования было получение персонифицированного биопластического материала на основе растворимой формы стабилизированного внеклеточного матрикса и изучение его физических и цитотоксических свойств.

Для изготовления биопластического материала использовали коллаген I типа, гиалуроновую кислоту и эластин в соотношениях, равных соотношения в дерме взрослого человека. Процесс получения включал в себя четыре основные стадии: приготовление исходной смеси, введение гелирующего агента, заморозка полученных образцов и вакуумная сублимационная сушка. Конечным продуктом является биоматериал, максимально приближенный к физиологическим параметрам дермы кожи и состоящий из трехмолекулярно перекрещенных нитей ВМ и обогащенный биологически активными молекулами.

Персонифицированные биологически активные компоненты получали методом ультрафильтрации кондиционированной среды аутологичных фибробластов в режиме тангенциального потока на установке LabScale (Millipore, США) на специализированных кассетах Pellicon XL (Millipore, США) размером 10 и 50 КДа.

Полученный биопластический материал характеризуется пористой структурой, а также высокой стабильностью в культуральной среде. Оценку цитотоксичности и биосовместимости биопластического материала с включенными БАК проводили путем совместного культивирования клеток с материалом и путем культивирования клеток на биоматрице в течение 72 часов. Оценивали наличие слущенных клеток в культуральной жидкости, форму и размеры клеток, структуру клеток. Осуществляли подсчет клеток с оценкой жизнеспособности на автоматизированном счетчике Countess (Invitrogen, Korea) с расчетом пролиферативной активности. Для выявления клеток на биоматериале проводили окраску ядерным флуоресцентным красителем DAPI.

В ходе эксперимента мы не обнаружили токсического воздействия исследуемого материала на популяцию клеток. Вместе с тем, при культивировании фибробластов в присутствии образцов материала пролиферативная активность была выше, чем в группе контроля (без материала). Окраска с помощью DAPI показала наличие ядер клеток на материале как в центре, так и на периферии.

Полученные данные позволили сделать вывод, что полученный матрикс является биологически активным, обладает биологической совместимостью, повышая пролиферативный потенциал клеток, и может выступать в роли биодеградируемого скаффолда. Это создает предпосылку к его использованию в различных областях медицины, таких как комбустиология, пластическая хирургия и травматология.

#### Литература:

1. 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*. 2015. 21(1-2): 35–44.
2. Шумаков В.И., Севастьянов В.И. Биополимерные матриксы для искусственных органов и тканей. *Здравоохранение и медицинская техника*. 2003. № 4. С. 30-32.
3. Рахматуллин Р.Р. Биопластический материал на основе гидроколлоида гиалуроновой кислоты и пептидного комплекса. для восстановительной и реконструктивной хирургии. Дисс. д.м.н. 2014. г. Москва.
4. Sachlos E, Czernuszka JT. *Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds*. *Eur Cell Mater*. 2003. 30;5:29-39
5. Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. *Biomaterials for stem cell differentiation*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008. 14;60(2):215-28.

УДК: 604, ББК: 52.5

## PERSONALIZED BIOPLASTIC MATERIAL BASED ON SOLUBLE AND DECELLULARIZED EXTRACELLULAR MATRIX FOR REGENERATIVE MEDICINE.

I.Gilmutdinova <sup>1</sup>, P.Eremin <sup>1</sup>, N.Menshutina <sup>2</sup>, D.Lovskaya <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal state budgetary institution "National Medical Research Center of Rehabilitation and Balneology" of Ministry of Healthcare of the Russian Federation., Russia, , Moscow, Novy Arbat , 32

<sup>2</sup> International Science and Educational Center for transfer of pharmaceutical and biotechnologies D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Russia, 125047, Moscow, Miusskaya sq, 9

We developed an innovative technology to obtain personal bioplastic material from a soluble form of a stabilized extracellular matrix (ECM). The primary components are I-type collagen, hyaluronic acid and elastin applied at the same ratio as in the dermis of an adult. The bioactive agents that we use are peptides of 10 – 50 kDa retrieved from autologous proliferated active fibroblasts.

**Key words:** personalized medicine, tissue engineering, cells technologies, collagen; human fibroblasts; bioplastic material.

The strategy of development of medical science in the Russian Federation for the period up to 2025 defines technologies of regenerative medicine in general and biotechnologies in particular as health care priorities. In this regard, current health care trends include development of bioactive matrices for regeneration of lost or damaged human tissue structures.

The today's market of bioplastic materials offers mainly products of decellularized dermis: porcine or human donor's[1]. At the same time, synthetic wound dressings are widely used. They are usually vitalized by allogeneic donor cells, their major drawbacks are high price and a large percentage of adverse side effects.

One of the promising biomaterials is a biomaterial obtained from ECM tissues used in combustiology, traumatology and plastic surgery. This technique provides cells with optimized microenvironment that encourages growth of 3D structured tissue. However, the mechanisms of organ-specific historegeneration that were studied at anatomic, biochemical and molecular levels require creation of a new generation of bioplastic personal materials. Their complex pharmacological system with specific pharmaceutical effects of a historeparant should be maximum close to tissues or organs as far as fiber architecture is concerned[2-3]. Basically, they are complex pharmaceutical drugs represented by a physiologically active matrix and an immobilized in it molecule with a certain pharmaceutical effect.

The goal of this research was to obtain personal bioplastic material from a soluble form of a stabilized extracellular matrix and to study its physical and cytotoxic properties.

For production of a bioplastic material we used I-type collagen, hyaluronic acid and elastin applied at the same ratio as in the dermis of an adult. The process of production included 4 main stages: composition of initial mixture, introduction of a gelling agent, freezing of obtained samples and vacuum sublimation drying. The end product is a biomaterial that is maximum close to dermis physiological parameters, composed of trimolecular crossed ECM strands and enriched with bioactive molecules.

Personal bioactive components were retrieved by ultrafiltration of a conditioned medium of autologous fibroblasts in tangential flow mode on LabScale device (Millipore, USA), using specific 10 and 50 kD Pellicon XL cassettes (Millipore, USA).

The obtained bioplastic material has pore structure and is highly stable in culture medium. Cytotoxicity and biocompatibility of a bioplastic material with included bioactive agents were assessed by co-cultivation of cells with the material and by cultivation of cells on a biomatrix within 72 hours. We assessed the presence of squamous cells in a culture liquid, forms and sizes of cells, cell structure. We calculated cells and evaluated viability on the Countess (Invitrogen, Korea) with a calculation of proliferative activity. In order to reveal cells on the biomaterial, we carried out staining with fluorescent dye DAPI.

In the course of experiment, we did not detect any toxic effect of a test material on cell population. At the same time, during cultivation of fibroblasts in the presence of material samples, the proliferative activity was higher than in a control group (without material). Staining with DAPI revealed the presence of cell nucleuses on the material both in the center and in the periphery.

The obtained data allow to conclude that the retrieved matrix is bioactive and biocompatible, increases cells' proliferative potential and is able to act as a biodegradable scaffold. This creates an opportunity to use it in various areas of medicine, such as combustiology, plastic surgery and traumatology.

References:

1. 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*. 2015. 21(1-2): 35–44. 2. Shumakov VI, Sevastyanov VI Biopolymer matrices for artificial organs and tissues. *Health care and medical equipment*. 2003. № 4. P. 30-32. 3. Rakhmatullin R.R. Bioplastic material based on hyaluronic acid hydrocolloid and peptide complex. for reconstructive and reconstructive surgery. *Diss. Ph.D.* 2014. Moscow. 4. Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2003. 30;5:29-39 5. Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008. 14;60(2):215-28.

УДК: 579.6: 615

## ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО МИЦЕЛИЯ *LAETIPORUS SULPHUREUS* MZ-22 И *FOMITOPSIS OFFICINALIS* TYV-2006 НА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Гаврюшина И.А.

ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия  
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.  
e-mail: irina-alekcandrovna2013@yandex.ru

Исследована продуктивность биомассы иммобилизованного мицелия *L. sulphureus* MZ-22 и *F. officinalis* Tyv-2006 на бактериальной целлюлозе при совместном жидкофазном культивировании с *G. hansenii* GH-1/2008. Показана доля иммобилизованного мицелия. Определено количество белка в мицелии.

**Ключевые слова:** базидиомицеты; *Laetiporus sulphureus*; *Fomitopsis officinalis*; иммобилизованный мицелий; бактериальная целлюлоза; *Gluconacetobacter hansenii*; жидкофазное культивирование

Базидиомицеты *L. sulphureus* и *F. officinalis* являются продуцентами биологически активных соединений (каротиноидов, агарциновой кислоты, бета-глюканов и других). Однако эти продуценты медленно растут в условиях жидкофазного культивирования [1, 2]. Одним из важнейших способов увеличения продуктивности биомассы базидиомицетов является культивирование мицелия с иммобилизацией продуцента. В качестве носителя для культивирования был использован биополимер бактериальная целлюлоза, который нетоксичен, не содержит примесей и имеет хорошую пористость. Этот биополимер рекомендуют использовать при иммобилизации ферментов клеток прокариот и эукариот [3].

Целью исследования являлось увеличение продуктивности биомассы мицелия штаммов *L. sulphureus* MZ-22 и *F. officinalis* Tyv-2006 в условиях совместного жидкофазного культивирования с продуцентом бактериальной целлюлозы.

Для получения иммобилизованного мицелия на бактериальной целлюлозе проводили совместное жидкофазное стационарное культивирование каждого штамма базидиомицета *Laetiporus sulphureus* MZ-22 (ВКМ F-4276D) и *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006 (ВКПМ F-982) с продуцентом бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ B-10547). В исследованиях использовали модифицированную синтетическую питательную среду Н-5. Исследования показали, что в условиях совместного культивирования с продуцентом бактериальной целлюлозы продуктивность биомассы мицелия составила для *L. sulphureus* – 13,44 г/л и *F. officinalis* – 11,36 г/л, что выше, чем при культивировании в монокультуре. При монокультивировании выход биомассы мицелия *L. sulphureus* составляет 2,87 г/л и *F. officinalis* – 3,55 г/л.

По количеству белка, определяемому методом Брэдфорд [4] в полученной биомассе, оценивали процентное содержание иммобилизованного мицелия штаммов. Содержание белка в мицелии *L. sulphureus* – 17,07 ± 0,35 % и *F. officinalis* – 11,85 ± 0,29 %, как в чистой культуре, так и при совместном культивировании, достоверно различаются между собой. Как показали полученные результаты, содержание мицелия в полученной биомассе составляет для *L. sulphureus* - 75,17 %, а для *F. officinalis* – 73,00 %. Таким образом, выход биомассы мицелия продуцентов увеличен соответственно для *L. sulphureus* в 4,7 и *F. officinalis* 3,2 раза. Предложенный метод является перспективным для увеличения продуктивности биомассы – источника биологически активных соединений.

Literatura:

1. Kovács D., Vetter J. Chemical composition of mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill // *Acta Alimentaria*.

2015. Vol. 44. № 1. P. 104–110.

2. Han J., Li L., Zhong J., Tohtaton Z. et al. *Officinalonic acids A-H, lanostane triterpenes from the fruiting bodies of Fomes officinalis* // *Phytochemistry*. 2016. P. 193–200.

3. Sulaeva I., Henniges U., Rosenau Th., Potthast A. // *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33. № 8. P. 1547-1571.

4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem*. 1976. Vol. 72. P. 248-254.

UDC: 579.6: 615

## OBTAINING THE IMMOBILIZED MYCELIUM OF LAETIPORUS SULPHUREUS MZ-22 AND FOMITOPSIS OFFICINALIS TYV-2006 ON BACTERIAL CELLULOSE

Gavryushina I.A.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

119991, Moscow, Trubetskaya st., 8/2

e-mail: irina-alekscandrovna2013@yandex.ru

The productivity of the biomass of immobilized mycelium *L. sulphureus* MZ-22 and *F. officinalis* Tyv-2006 on bacterial cellulose was studied in a combined liquid-phase culture with *G. hansenii* GH-1/2008. The fraction of immobilized mycelium is shown. The amount of protein in the mycelium is determined.

**Key words:** basidiomycetes; *Laetiporus sulphureus*; *Fomitopsis officinalis*; immobilized mycelium; bacterial cellulose; *Gluconacetobacter hansenii*; liquid-phase culture

Basidiomycetes *L. sulphureus* and *F. officinalis* are producers of biologically active compounds (carotenoids, agaric acid, beta-glucans and others). However, these producers slowly grow under conditions of liquid-phase cultivation [1, 2]. The basic properties of biomass of basidiomycetes are cultivation of mycelium with immobilization of the producer. As a carrier for cultivation, a biopolymer of bacterial cellulose was used which is non-toxic, free of impurities and has good porosity. This biopolymer is recommended for use in the immobilization of enzymes of prokaryotic cells and eukaryotes [3].

The aim of the study was to increase the productivity of mycelium biomass of *L. sulphureus* MZ-22 and *F. officinalis* Tyv-2006 strains under conditions of liquid-phase cultivation with a producer of bacterial cellulose.

To obtain an immobilized mycelium on bacterial cellulose, a combined liquid-phase stationary cultivation of each basidiomycetes strains *Laetiporus sulphureus* MZ-22 (VKM F-4276D) and *Fomitopsis officinalis* Tyv-2006 (VKPM F-982) with a producer of bacterial cellulose *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (VKPM B-10547). In the studies, a modified synthetic nutrient medium H-5 was used. Studies have shown that under conditions of co-cultivation with a bacterial cellulose producer, the productivity of mycelium biomass for *L. sulphureus* is 13.44 g/l and *F. officinalis* is 11.36 g/l, which is higher than for cultivation in monoculture. In monoculture, the yield of biomass of mycelium *L. sulphureus* is 2.87 g/l and *F. officinalis* - 3.55 g/l.

According to the amount of protein determined by the Bradford method [4] in the obtained biomass, the percentage of immobilized mycelium strains was estimated. The protein content in the mycelium of *L. sulphureus* is  $17.07 \pm 0.35$  % and *F. officinalis* is  $11.85 \pm 0.29$  %, both in pure culture and in cultivation, improperly differ among themselves. As the results showed, the content of mycelium in the obtained biomass is 75.17 % for *L. sulphureus*, and 73.00 % for *F. officinalis*. Thus, the yield of biomass of the mycelium of the producers is increased correspondingly for *L. sulphureus* in 4.7 and *F. officinalis* 3.2 times. The proposed method is promising for increasing the productivity of biomass - the source of biologically active compounds.

### References:

1. Kovács D., Vetter J. *Chemical composition of mushroom Laetiporus sulphureus (Bull.) Murill* // *Acta Alimentaria*. 2015. Vol. 44. № 1. P. 104–110.
2. Han J., Li L., Zhong J., Tohtaton Z. et al. *Officinalonic acids A-H, lanostane triterpenes from the fruiting bodies of Fomes officinalis* // *Phytochemistry*. 2016. P. 193–200.
3. Sulaeva I., Henniges U., Rosenau Th., Potthast A. // *Biotechnology Advances*. 2015. Vol. 33. № 8. P. 1547-1571.
4. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem*. 1976. Vol. 72. P. 248-254.

УДК: 579.6, ББК: 615

## ПОЛУЧЕНИЕ МАТРИКСОВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ: СПОСОБЫ ОЧИСТКИ ОТ КЛЕТОК ПРОДУЦЕНТА И ЭНДОТОКСИНОВ

М.В.Булат <sup>1</sup>, К.В.Дутка <sup>2</sup>

<sup>1</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, bulat@polly.phys.msu.ru, +79772831696

<sup>2</sup> МГМУ им. Сеченова, Россия, 143442, пос. Отрадное, Айвазовского, 1, bulat@polly.phys.msu.ru, +79772831696

Исследована продуктивность бактериальной целлюлозы штамма *Gluconacetobacter hansenii* в условиях жидкофазного статического культивирования. Самые высокие показатели отмечены на среде с фруктозой. Показаны эффективные методы освобождения матриц от клеток продуцента и эндотоксинов, обеспечивающие низкие показатели эндотоксина и отсутствие цитотоксичности.

**Ключевые слова:** бактериальная целлюлоза, *Gluconacetobacter hansenii*, цитотоксичность, наноматериал, эндотоксины, сверхкритический CO<sub>2</sub>

Бактериальная целлюлоза – полимер, синтезируемый отдельными представителями прокариот. Она отличается молекулярной структурой и высокой химической чистотой от растительной целлюлозы. Она характеризуется более высокой эластичностью, модулем прочности на разрыв, сорбционностью, пористостью и, что очень важно для медицины, полной биосовместимостью. В настоящее время различными исследователями получены различные формы бактериальной целлюлозы, такие как плёнки, трубки, аэрогели, которые активно исследуются. Пленочные материалы бактериальной целлюлозы уже используются в практике [1, 2].

Цель исследований: оценить продуктивность *Gluconacetobacter hansenii* в статических условиях культивирования на различных источниках углерода; разработать методы освобождения матриц бактериальной целлюлозы от клеток и эндотоксинов для направленного использования в медицине.

Получение биополимера бактериальной целлюлозы проводили с использованием штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) [3]. Штамм культивировали на модифицированной нами синтетической среде С. Хестрина и М. Шрамма [4] с различными источниками углерода.

При статическом культивировании получали пленки различной толщины и прочности. Продуктивность штамма *G. hansenii* при статическом культивировании на различных источниках углерода составляла от 0,2 г/л (на галактозе) до 3,2 г/л (на фруктозе).

Важным показателем качества медицинских материалов на основе бактериальной целлюлозы является отсутствие в них клеток продуцента и эндотоксинов. Освобождение матриц бактериальной целлюлозы от клеток и эндотоксинов проводили двумя методами: в первом варианте отмыванием в 5 %-м растворе соли додецилсульфат натрия и в растворе RIPA в течение 78 часов с дальнейшим промыванием дистиллированной водой. Во втором способе использовали метод одно-, двух- и трехкратного отмывания в различных бифазных системах на основе суб- и сверхкритического CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>/C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) в реакторах для сверхкритической обработки под давлением 300-500 атм. при температурах 25-40 °С. Контроль присутствия клеток продуцента в матрицах проводили методом атомно-силовой микроскопии и микробиологическим анализом. Определение количества остаточного эндотоксина в пленках бактериальной целлюлозы проводили согласно требованиям стандартов GMP для пленочных материалов [5, 6] методом гель-тромб теста с помощью лизата амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив, Limus AmebocyteLysate, Reagent, U.S. License No 1197, Charles River Endosafe, США). Результаты исследований показали более высокую эффективность освобождения пленочных матриц бактериальной целлюлозы методом отмывания раствором RIPA. При таком методе обработки количество эндотоксина отвечает требованиям стандарта GMP для медицинских покровных материалов. Методы обработки суб- и сверхкритическим диоксидом углерода в бифазных системах показывают значительное снижение присутствия эндотоксинов и бактерий продуцента в матрицах, однако требуют усовершенствования.

Оценку токсичности пленок бактериальной целлюлозы проводили с применением простейших *Parameciumcaudatum* и *Tetrahymenauriformis*. Исследования показали отсутствие цитотоксичности образцов бактериальной целлюлозы, отмываемых додецилсульфатом натрия и раствором RIPA, в то время как матрицы бактериальной целлюлозы, отмываемые в бифазных системах CO<sub>2</sub>, показывали незначительную токсичность.

Определены условия для наиболее продуктивного роста бактериальной целлюлозы штамма



*Gluconacetobacter hansenii* в условиях жидкофазного статического культивирования. Исследованы возможности суб- и сверхкритической очистки матриц бактериальной целлюлозы. Показаны эффективные методы освобождения матриц от клеток продуцента и эндотоксинов, обеспечивающие низкие показатели эндотоксина и отсутствие цитотоксичности.

Литература:

1. Sulaeva I., Henniges U., Rosenau Th., Potthast A. // *Biotechnology Advances*. 2015. Volume 33, Issue 8, December 2015, pp. 1547-1571.
2. Khairullin, A.R., Temnikova, N.E., and Pautov, V.D. // *Vestn. Kazan. Tekhnol. Univ.*, 2013, vol. 16, no. 2, pp. 89–91.
3. Patent RF. 2012. № 2464307.
4. Hestrin S., Schramann M. // *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose* // *Biochemical Journal*. 1952. V 58. №2. - pp.345-352.
5. *Bacterial Endotoxin test «85»*. In *The U.S. Pharmacopeia*. 23rd rev. Mack Publishing Co., Easton PA, 1995.
6. *US (June 2012) Guidance for industry—pyrogen and endotoxins testing*. In: *Services USDoHH (ed)*. U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, p 11.

UDC 579.6, BBC 615

## OBTAINING OF BACTERIAL CELLULOSE MATRICES: METHODS OF PURIFICATION FROM THE CELLS OF THE PRODUCER AND ENDOTOXINES

M.Bulat <sup>1</sup>, K.Dutka <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov MSU, Russia, 119234, Moscow, Leninskiye gory, 1

<sup>2</sup> Sechenov University, Russia, 143442, Otradnoye, Aivazovskogo, 1

The productivity of bacterial cellulose of the strain of *Gluconacetobacter hansenii* under conditions of liquid-phase static cultivation was studied. The highest rates were observed on medium with fructose. Effective methods for the purification of matrices from producer cells and endotoxins are shown. The methods ensure low endotoxin levels and the absence of cytotoxicity.

**Key words:** bacterial cellulose, *Gluconacetobacter hansenii*, cytotoxicity, nanomaterial, endotoxins, supercritical CO<sub>2</sub>

Bacterial cellulose is a polymer, synthesized by individual prokaryotes. In comparison with plant cellulose it has different molecular structure and higher chemical purity. It is also characterized by higher elasticity, tensile strength modulus, sorption capacity, porosity and, which is very important from the point of view of medicine, it has full biocompatibility. So far, different researchers have obtained various forms of bacterial cellulose, such as films, tubes, aerogels, which are under active investigation. Film materials of bacterial cellulose are also already present in practical use. [1, 2].

Objective: to evaluate the productivity of *Gluconacetobacter hansenii* under static conditions of cultivation at various carbon sources; to develop methods for the release of bacterial cellulose matrices from cells and endotoxins for direct use in medicine.

Preparation of bacterial cellulose was carried out using *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (VKPM B-10547) strain [3]. This strain was cultured on the modified synthetic medium of S. Hestrin and M. Shramm [4] with various sources of carbon.

With a static culture, films of varying thickness and strength were obtained. The productivity of the strain of *G. hansenii* during static cultivation on different carbon sources was from 0.2 g / l (on galactose) to 3.2 g / l (on fructose).

An important indicator of the quality of medical materials based on bacterial cellulose is the absence of producer cells and endotoxins inside of the matrix. The purification of bacterial cellulose matrices from cells and endotoxins was carried out in two ways: 1) by washing in a 5% solution of sodium dodecyl sulphate and in RIPA solution for 78 hours with further washing with distilled water; 2) one-, two- and three-time treatment in various biphasic systems based on sub- and supercritical CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> / C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) in supercritical vessels at 300-500 atm. at temperatures of 25-40 ° C.

Control of the presence of producer cells in matrices was carried out by atomic force microscopy and microbiological analysis. The determination of the amount of residual endotoxin in bacterial cellulose films was carried out according to the requirements of GMP standards for film materials [5, 6] by LAL-test (LAL reagent, Limus AmebocyteLysate, Reagent, US License No. 1197, Charles River Endosafe, USA). The results of the studies showed

a high efficiency of purification of bacterial cellulose film matrices by washing with RIPA solution.

With this treatment method, the amount of endotoxin meets the requirements of the GMP standard for medical coating materials. The treatment of sub- and supercritical carbon dioxide in biphasic systems shows a significant reduction in the presence of endotoxins and producer bacteria in matrices, but they require some improvement.

The toxicity of the bacterial cellulose films was assessed using the simplest *Paramecia caudatum* and *Tetrahymena pyriformis*. Studies showed no cytotoxicity of bacterial cellulose samples washed with sodium dodecyl sulphate and RIPA solution, while bacterial cellulose matrices washed in biphasic CO<sub>2</sub> systems showed little toxicity.

The conditions for the most productive growth of bacterial cellulose of the strain of *Gluconacetobacter hansenii* under conditions of liquid-phase static cultivation are determined. The possibilities of sub- and supercritical purification of bacterial cellulose matrices were studied. Effective methods for the purification of matrices from producer cells and endotoxins are shown, which ensure low endotoxin levels and the absence of cytotoxicity.

#### References:

1. Sulaeva I., Henniges U., Rosenau Th., Potthast A. // *Biotechnology Advances*. 2015. Volume 33, Issue 8, December 2015, pp. 1547-1571.
2. Khairullin, A.R., Temnikova, N.E., and Pautov, V.D. // *Vestn. Kazan. Tekhnol. Univ.*, 2013, vol. 16, no. 2, pp. 89–91.
3. Patent RF. 2012. № 2464307.
4. Hestrin S., Schramann M. // *Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose* // *Biochemical Journal*. 1952. V 58. №2. - pp.345-352.
5. *Bacterial Endotoxin test «85»*. In *The U.S. Pharmacopeia*. 23rd rev. Mask Publishing Co., Easton PA, 1995.
6. *US (June 2012) Guidance for industry—pyrogen and endotoxins testing*. In: *Services USDoHH (ed)*. U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, p 11.

УДК 577.114.4:606

## ПОЛУЧЕНИЕ ПЛЕНОК И ВЫСОКОПОРИСТЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИМИЧЕСКОЙ СШИВКОЙ

Сажнев Н.А., Кильдеева Н.Р., Лозинский В.И.

Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологии. Дизайн. Искусство), Москва, Россия 117997, Москва, ул. Садовническая, д. 33, стр. 1  
Институт элементоорганических соединений имени А. Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия 119991, ГСП-1, Москва, 119334, ул. Вавилова, 28  
e-mail: nsazhnev@mail.ru

Разработан способ получения сшитых дженипином гидрогелей и пленок хитозана. Показано, что увеличение степени сшивки приводит к снижению степени набухания и скорости биодеградации полученных материалов.

**Ключевые слова:** хитозан, химическая сшивка, биополимеры, дженипин

Одним из направлений в исследовании и применении хитозана является разработка биополимерных матриц для тканевой инженерии. Целью тканевой инженерии является регенерация поврежденных тканей и органов [1]. Хитозан в виде гидрогелей всё чаще используется в биоинженерии, так как он ускоряет ранозаживление и обладает бактериостатическими свойствами [2].

Для получения гидрогелей на основе хитозана необходимо осуществить химическое сшивание макромолекул в растворе, при этом наиболее целесообразно для этой цели использовать биосовместимые природные соединения, поэтому актуальным является разработка метода получения матриц и плёнок из хитозана с использованием дженипина (Gp).

В проведенных ранее исследованиях показано [3], что процесс сшивки сопровождается сложными превращениями с участием молекул дженипина, приводящими в конечном итоге к появлению олигомерных сшивок с системой сопряженных связей, вызывающей появление ярко-синей окраски у материалов из хитозана, сшитого дженипином.

Для получения гидрогелей использовали 2 %-ные растворы ацетата хитозана в воде. pH исходных растворов 3,8. Для изучения влияния pH на гелеобразование в растворах ацетата хитозана были также получены растворы с pH 5,6.

Время гелеобразования сильно зависит от pH: при pH 5,6, и соотношении Gp/NH<sub>2</sub> 0,04 моль/моль гелеобразование происходит в течение трех часов, а при pH 3,8 в 3 раза дольше. Повышение температуры

также приводило к существенному снижению времени гелеобразования.

Для придания гидрогелям на основе хитозана, сшитого дженипином, системы сообщающихся пор был использован способ, при котором шивку дженипином проводили на уже сформированных путем лиофильной сушки губчатых образцах хитозана.

Поверхность и внутренняя структура полученных полимерных матриц была исследована методами оптической микроскопии. Результаты исследования свидетельствуют о том, что полученные материалы обладают системой пор, размер которых можно изменять, меняя соотношение функциональных групп сшивающего реагента и хитозана.

Формование плёнок осуществляли методом полива на чашки Петри растворов хитозана, содержащих дженипин, и испарения растворителя до постоянной массы.

Биополимерный матрикс должен деградировать, поэтому нами был исследован процесс биодеградации *in vivo* в растворе лизоцима. Было выявлено, что потеря веса гидрогелей и плёнок, помещённых в раствор, содержащий лизоцим, происходит сильнее, чем при инкубации в растворе, не содержащем лизоцим, что указывает на ферментативное разрушение хитозана, сшитого дженипином.

Увеличение степени шивки для всех исследованных систем приводило к снижению скорости деградации и степени набухания. Таким образом, варьируя этот параметр, можно изменять скорость разложения материала в организме.

*Литература:*

1. Rinaudo M. *Chitin and chitosan: Properties and applications* // *Prog. Polym. Sci.* – 2006. – Vol.31. – №7 – P.603–632.
2. Кильдеева Н.Р., Михайлов С.Н. Гидрогели хитозана, модифицированного бифункциональными сшивающими реагентами // *Хитозан* / под ред. К.Г. Скрябина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. – Москва: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. – С. 271-307.
3. Кильдеева Н.Р., Касаткина М.А., Михайлов С.Н. Особенности получения биосовместимых плёнок на основе хитозана, сшитого дженипином // *Все материалы. Энциклопедический справочник.* – 2016. – №4. – С. 9-14.

UDC 577.114.4:606

## PREPARATION OF FILMS AND HIGH-POROUS POLYMER MATRICES BASED ON CHITOSAN MODIFIED BY CHEMICAL CROSS-LINKING

Sazhnev N.A., Kildeeva N.R., Lozinsky V.I.

A.N. Kosygin Russian State University (Technology. Design. Art), Moscow, Russia

A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement compounds Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 119991, GSP-1, Moscow, V-334, Vavilova St. 28

e-mail: nsazhnev@mail.ru

An optimal method for producing chitosan hydrogels and films crosslinked with genipin has been developed. It is shown that an increase in the degree of cross-linking leads to a decrease in the degree of swelling and the rate of biodegradation of the obtained materials.

**Key words:** chitosan, chemical cross-linking, biopolymers, genipin

One of the areas in the study and application of chitosan is the development of biopolymer matrices for tissue engineering. The purpose of tissue engineering is the regeneration of damaged tissues and organs [1]. Chitosan is increasingly used in bioengineering, since it accelerates wound healing and exhibits bacteriostatic properties. Chitosan is used as a component of hydrogels of various types [2].

To obtain hydrogels based on chitosan, it is necessary to crosslink chemically the macromolecules in solution, and natural compounds are most suitable for the crosslinking purposes, so it is important to develop the methods for the preparation of matrices and films from chitosan and using genipin (Gp).

In previous studies, it was shown [3] that the cross-linking process is accompanied by complex transformations with the participation of genipin molecules, thus resulting ultimately in the appearance of oligomeric cross-links with a conjugation system of unsaturated bonds, which causes the appearance of a bright blue color in the materials of chitosan crosslinked by genipin.

To obtain hydrogels, 2% solutions of chitosan acetate in water were used. The pH of the starting solutions was 3.8. To study the effect of pH on gelling in solutions of chitosan acetate, solutions with a pH of 5.6 were also obtained.

The time of gelling strongly depends on pH: at pH 5.6, and the ratio Gp / NH<sub>2</sub> 0.04 mol/mol, gelation occurs for three hours, and at 3.8 the process is 3 times longer.

An investigation of the influence of temperature on the gelling process showed that an increase in temperature also resulted in a significant decrease in the gelling time.

To impart porosity to the hydrogels based on chitosan crosslinked with genipin, a method was used, in which genipin crosslinking was carried out on chitosan acetate sponge formed by lyophilic drying. The surface and internal structure of the resulting matrices were studied by optical microscopy.

The results of the study indicate that the obtained materials have a pore system, and the pore size can be varied by changing the ratio of the functional groups of the crosslinker and chitosan.

The films were formed by casting of chitosan solutions containing genipin in the Petri dishes. The samples were held until the solvent was evaporated to a constant weight.

The biopolymer matrix must be biodegradable, so we studied the in vitro biodegradation process in a solution of lysozyme. It was found that the loss of weight of hydrogels and films placed in a solution containing lysozyme is stronger than when incubated in a solution that does not contain lysozyme, this fact indicates the enzymatic destruction of chitosan crosslinked with genipin.

The increase in the degree of cross-linking for all the systems studied led to a decrease in the rate of degradation. Thus, by varying this parameter, you can change the rate of decomposition of the material in the body.

#### References:

1. Rinaudo M. *Chitin and chitosan: Properties and applications* // *Prog. Polym. Sci.* - 2006. - Vol.31. - No. 7 - P.603-632.
2. Kildeeva N.R., Mikhaylov S.N. *Hydrogels of chitosan modified with bifunctional cross-linking reagents* // *Chitozan / ed. K.G. Scriabin, S.N. Mikhailova, V.P. Varlamov.* - Moscow: Center for Bioengineering, RAS, 2013. - P. 271-307.
3. Kildeeva N.R., Kasatkina M.A., Mikhaylov S.N. *Features of obtaining biocompatible films based on chitosan, cross-linked genipin* // *All materials. Encyclopedic reference book.* - 2016. - №4. - P. 9-14.

УДК 543

## ПОЛУЧЕНИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ МЕТОДОМ ГИДРОТЕРМАЛЬНОГО СИНТЕЗА НА ОСНОВЕ ДЕКСТРАН СУЛЬФАТА НАТРИЯ

Николаева А.Н <sup>1</sup>., Вострикова А.М <sup>1</sup>., Бакал А.А <sup>1</sup>., Сухоруков Г.Б <sup>1,2</sup>., Горячева И.Ю <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Саратовский государственный университет, Саратов, Россия

<sup>2</sup> Лондонский университет королевы Марии, Лондон, Великобритания  
бакалавр

Саратовский Государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Институт Химии, 410012, Саратов, Астраханская, 83

E-mail: stasia.nik19961@yandex.ru

**Ключевые слова:** наночастицы, углеродные наночастицы, декстран сульфат натрия, гидротермальный синтез

Люминесцентные наночастицы быстро вошли в современный мир в качестве меток. Они находят свое применение в биологических исследованиях, медицине, мониторинге и технике. Их особенностями являются: высокий квантовый выход люминесценции, фото-, физическая, и химическая стабильность.

Одними из таких частиц являются углеродные наноконпозиты. Они получили известность в последние годы ввиду их особых свойств, таких, как отсутствие токсичных компонентов, низкая плотность, высокая удельная поверхность, а также термическая и механическая стабильность, широкий ассортимент доступных материалов и размеры порядка единиц нанометров. В качестве источника углерода для синтеза углеродных наночастиц можно использовать большое количество органических молекул, содержащих углерод в своей основе.

Целью нашей работы явилось получение углеродных наночастиц (УНЧ) из декстран сульфата натрия (ДС) в растворах и в порах карбоната кальция. Метод основан на обработке в условиях высокой температуры и давления раствора ДС в ядрах, полученных путем соосаждения солей хлорида кальция и карбоната натрия. Характеризация полученных частиц проводилась с помощью спектральных и электронно-микроскопических методов.

Работа выполнена при поддержке РФ (проект 16-13-10195) и МОН (проект 4.1063.2017/4.6).

UDC 543

## PRODUCTION OF CARBON NANOPARTICLES BY HYDROTHERMAL SYNTHESIS OF SODIUM DEXTRAN SULFATE SOLUTIONS

Nikolaeva A.N <sup>1</sup>., Vostrikova A.M <sup>1</sup>., Bakal A.A <sup>1</sup>., Sukhorukov G.B <sup>1,2</sup>., Goryacheva I. Yu <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Saratov State University, Saratov, Russia

<sup>2</sup> Queen Mary University of London, London, United Kingdom

bachelor

Saratov State University named after N.G. Chernyshevsky, Institute of Chemistry, 410012, Saratov, Astrakhanskaya, 83

E-mail: stasia.nik19961@yandex.ru

**Key words:** nanoparticles, carbon nanoparticles, dextran sulfate sodium salt, hydrothermal synthesis.

Luminescent nanoparticles quickly entered the range of luminescent labels. They find their application in biological research, medicine, monitoring and technology. Their features are: high quantum yield of luminescence, photo-, physical, and chemical stability.

One of such particles are carbon nanocomposites. They have become known in recent years because of their special properties, such as the absence of toxic compounds, low density, high specific surface area, as well as thermal and mechanical stability, a wide range of available materials and size on the order of units of nanometers. As a carbon source for the synthesis of carbon nanoparticles a large number of organic molecules can be used.

The purpose of our work was to obtain carbon nanoparticles (CNPs) from sodium dextran sulfate (DS) in solutions and in pores of calcium carbonate. The method is based on the treatment at high temperature and pressure of a solution of DS in nuclei obtained by co-precipitation of calcium chloride and sodium carbonate salts. Characterization of the obtained particles was carried out with the help of spectral and electron-microscopic methods.

This work was supported by the RSF (project 16-13-10195) and Ministry of science and education (project 4.1063.2017/4.6).

УДК: 602.4:628.35:664

## РАЗРАБОТКА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ТОВАРОВ НАРОДНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ

А.Д.Туровская, А.С.Харькова, В.А.Арляпов

Тульский государственный университет, Россия, 300012, Тула, пр. Ленина, 92, anna\_turovskaya@mail.ru, 8(953)4374874

На основе найденной гетерогенной константы скорости переноса электронов и константы скорости восстановления медиатора клетками, было выбрано, для разработки биоанализатора, перспективный медиатор – ферроцен, а в качестве микроорганизмов-бактерии *Parasoccus uuei*. Найдены концентрации тяжелых металлов Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> при которых ингибирование рецепторного элемента достигает величины 50%.

**Ключевые слова:** интегральная токс.ичность, гетерогенная константа, константа скорости восстановления медиатора микроорганизмами, бактерии *Parasoccus uuei*, дрожжи *Debaryomyces hansenii*.

В последнее десятилетие отмечено интенсивным использованием лабораторных моделей анализаторов биотоксичности с использованием бактерий в качестве тест-организмов [1]. Наиболее предпочтительными являются биосенсоры, основанные на использовании в качестве акцепторов электронов - медиаторов. При выборе подходящего медиатора для амперометрического биосенсора полезным может оказаться метод циклической вольтамперометрии. Данный метод дает качественную и количественную информацию об электрохимически сопряженных ферментативных реакциях, на которых основано функционирование медиаторных амперометрических биосенсоров.

Микроорганизмы *D. hansenii* и *P. uuei*, используемые в медиаторном биосенсоре, могут обеспечить вы-

сокую чувствительность метода анализа, благодаря мгновенной реакции на токсиканты различного рода. Цель работы: изучение физико-химических и электрохимических закономерностей переноса электронов, протекающих в системе «субстрат – микроорганизмы – медиатор-угольнопастовый электрод».

Электрохимический процесс состоит из нескольких стадий: массоперенос к поверхности электрода и поверхностные явления (адсорбция и десорбция). Выявление лимитирующей по анализу зависимости предельного тока от скорости развертки [2] позволило применить модель Николсона [3] и модель Лавирона [4] для нахождения гетерогенной константы переноса электрона. На основе экспериментальных данных было установлено, что среди феназиновых (метиленовый синий, нейтральный красный, тионин, 2,6-дихлорфенолиндофенол) и металлоценовых (ферроцен, 1,1'-диметилферроцен, ферроценкарбоксальдегид, ферроценацетонитрил) медиаторов самый быстрый перенос электронов достигается в системе «ферроцен-угольнопастовый электрод» ( $0,4 \pm 0,1$  см $\cdot$ с $^{-1}$ ). Данный медиатор был выбран для дальнейших исследований.

Методом циклической вольтамперометрии были найдены константы взаимодействия медиатора ферроцена с дрожжами *D. hansenii* и бактериями *P. уееi* по методики [5]. Для дрожжей *D. hansenii* составила  $0,013 \pm 0,003$  дм $^3$ /г $\cdot$ с), бактерий -  $0,023 \pm 0,001$  дм $^3$ /г $\cdot$ с). Так как более эффективный перенос достигается в системе с бактериями были выбраны они для разработке.

Биосенсорные измерения проводили при потенциале 250 мВ, аналитическим сигналом явилась величина ингибирования, рассчитываемая по формуле (1).

$$\text{Ing}\% = (1 - I_1/I_2) \cdot 100\% \quad (1),$$

Были получены ингибирующие кривые для токсикантов: Cu $^{2+}$ , Zn $^{2+}$ , Cd $^{2+}$ , Pb $^{2+}$ , Ni $^{2+}$ , На основе которых были найдены концентрации тяжелых металлов, при которых ингибирование достигает величины 50%: 21,1, 47,5, 18,2, 3,3, 9,2 мг/л, соответственно.

Полученные результаты коррелируют с другими работами. Кроме того, разработанная система показывает большую чувствительность к ионам цинка, свинца, никеля, чем система на основе бактерий *E. coli* [6]. Для дальнейшего использования системы «ферроцен - *P. уееi*» требуется большее количество тестируемых токсикантов.

На основе данных циклической вольтамперометрии и амперометрических исследований были сделаны следующие выводы. 1. С учетом полученных гетерогенных констант скорости переноса электронов в системе «медиатор- угольно-пастовый электрод» установлено, что наиболее перспективным медиатором является ферроцен (Гетерогенная константа скорости переноса электронов для ферроцена составила  $0,4 \pm 0,1$  см $\cdot$ с $^{-1}$ ). 2. На основе полученных констант скорости восстановления медиаторов установлено, что наиболее перспективными микроорганизмами для создания амперометрического биосенсора являются бактерии *Parasoccus уееi* (Константа скорости восстановления ферроцена суспензией клеток составила  $0,023 \pm 0,001$  дм $^3$ /г $\cdot$ с)). 3. С помощью разработанного сенсора были определены концентрации тяжелых металлов Cu $^{2+}$ , Zn $^{2+}$ , Cd $^{2+}$ , Pb $^{2+}$ , Ni $^{2+}$ , при которых ингибирование достигает величины 50%: (Концентрация токсиканта, вызывающее 50% ингибирования: 21,1, 47,5, 18,2, 3,3, 9,2 мг/л).

#### Литература:

1. Gao G. et al. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium // *Analytica chimica acta*. 2016. Vol. 924. P. 21-28.
2. Степанова В. Б. Электрохимические ДНК-сенсоры на основе полиэлектролитных комплексов и наноразмерных медиаторов электронного переноса. – 2013.
3. Nicholson R. S. Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics // *Analytical chemistry*. – 1965. – Т. 37. – №. 11. – С. 1351-1355.
4. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1979. Vol. 101. №1. P. 19-28.
5. Kulys J. et al. Study of the new electron transfer mediators in glucose oxidase catalysis // *Journal of molecular catalysis*. – 1994. – Т. 91. – №. 3. – С. 407-420.
6. Fang D. et al. A reagentless electrochemical biosensor based on thionine wrapped *E. coli* and chitosan-entrapped carbon nanodots film modified glassy carbon electrode for wastewater toxicity assessment // *Electrochimica Acta*. – 2016. – Т. 222. – С. 303-311.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и Правительства Тульской области № 16-48-710959 р\_а (договор ДС/44)

UDC 602.4:628.35:664

## DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR TO DETERMINE THE INTEGRAL TOXICITY OF CONSUMER GOODS

A. Turovskaya, A. Kharkova, V. Urlyapov

Tula State University, Russia, 300012, Tula, Lenin, 92

Based on the heterogeneous rate constant of electron transfer and the rate constants of the recovery of the mediator cells, was chosen for the development of the Bioanalyzer, the prospective mediator is ferrocene, and the microorganisms-bacteria *Paracoccus yeei*. Concentrations of heavy metals  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  at which inhibition of receptor element reaches 50% were found.

**Key words:** integral toxicity, heterogeneous constant, the rate constant for recovery of the mediator microorganisms, bacteria *Paracoccus yeei*, yeast *Debaryomyces hansenii*.

The last decade has been marked by intensive use of laboratory models of analyzers of biotoxicity with use of bacteria as test organisms [1]. The most preferred are biosensors based on the use of electron mediators as acceptors. When choosing a suitable mediator for the amperometric biosensor, the method of cyclic voltammetry can be useful. This method gives qualitative and quantitative information about electrochemical conjugate enzymatic reactions, on which the functioning of mediator amperometric biosensors is based.

Microorganisms *D. hansenii* and *P. yeei*, used in the mediator biosensor, can provide a high sensitivity of the analysis method, thanks to an instant reaction to toxicants of various kinds. The aim of the work is to study the physico-chemical and electrochemical regularities of electron transport in the system "substrate – microorganisms – mediator-carbon-paste electrode".

Electrochemical process consists of several stages: mass transfer to the electrode surface and surface phenomena (adsorption and desorption). Identification limiting of the analysis the dependence of the limiting current on the scan rate [2] allowed us to apply the model of Nicholson [3] and the model of Laviron [4] for finding constants of heterogeneous electron transfer. On the basis of experimental data it was found that among the phenazine (methylene blue, neutral red, thionine, 2,6-dichlorophenolindophenol) and metallocene (ferrocene, 1,1'-dimethylferrocene, ferrocenecarboxaldehyde, ferrocenacetonitrile) mediators the fastest electron transfer is achieved in the system "ferrocene-carbon-paste electrode" ( $0,4 \pm 0,1 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). This mediator was chosen for further research.

The cyclic voltammetry method was used to find the interaction constants of the ferrocene mediator with *D. hansenii* yeast and *P. yeei* bacteria by the method [5]. For yeast *D. hansenii* was  $0,013 \pm 0,003 \text{ dm}^3 / (\text{g} \cdot \text{s})$ , bacteria -  $0,023 \pm 0,001 \text{ dm}^3 / (\text{g} \cdot \text{s})$ . Since more efficient transport is achieved in a system with bacteria they have been selected for development.

Biosensor measurements were carried out at a potential of 250 mV, the inhibition value calculated by the formula (1) was an analytical signal.

$$\text{In}g\% = (1 - I/I_0) \cdot 100\% \quad (1)$$

Inhibitory curves were obtained for toxicants:  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ . On the basis of which the concentrations of heavy metals were found, in which the inhibition reaches a value 50%: 21,1, 47,5, 18,2, 3,3, 9,2 mg / l, respectively.

The obtained results are correlated with other works. In addition, the developed system shows greater sensitivity to ions of Zn, Pb, Ni than the system based on bacteria *E. coli* [6]. For further use of the system "ferrocene - *P. yeei*" requires more number of test toxicants.

On the basis of cyclic voltammetry and amperometric studies were made the following conclusion: 1. Taking into account the obtained heterogeneous electron transfer rate constants in the system "mediator - carbon-paste electrode" it was found that the most promising mediator is ferrocene (Heterogeneous electron transfer rate constant for ferrocene was  $0.4 \pm 0.1 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). 2. Based on the obtained rate constants of mediators recovery it was found that the most promising microorganisms for the creation of amperometric biosensor are the bacteria *Paracoccus yeei* (the rate constant of ferrocene recovery by cell suspension was  $0.023 \pm 0.001 \text{ dm}^3 / (\text{g} \cdot \text{s})$ ). 3. With the help of the developed sensor were determined concentrations of heavy metals  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , in which the inhibition reaches a value of 50%: (toxicant Concentration that causes 50% inhibition: 21,1, 47,5, 18,2, 3,3, 9,2 mg / l).

References:

1. Gao G. et al. Development of a mediated whole cell-based electrochemical biosensor for joint toxicity assessment of multi-pollutants using a mixed microbial consortium // *Analytica chimica acta*. 2016. Vol. 924. P. 21-28.
2. Stepanova VB Electrochemical DNA-sensors based on polyelectrolyte complexes and nanoscale mediators of electron transfer. - 2013.
3. Nicholson R. S. Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics // *Analytical chemistry*. – 1965. – Т. 37. – №. 11. – С. 1351-1355.
4. Laviron E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1979. Vol. 101. №1. P. 19-28.
5. Kulys J. et al. Study of the new electron transfer mediators in glucose oxidase catalysis // *Journal of molecular catalysis*. – 1994. – Т. 91. – №. 3. – С. 407-420.
6. Fang D. et al. A reagentless electrochemical biosensor based on thionine wrapped E. coli and chitosan-entrapped carbon nanodots film modified glassy carbon electrode for wastewater toxicity assessment // *Electrochimica Acta*. – 2016. – Т. 222. – С. 303-311.

**Grant:** The work was supported by RFBR grant and the government of Tula region № 16-48-710959 p\_a (contract DS / 44).

УДК: 577.1 51, 577.181.4

## РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА НА ОСНОВЕ ХИТОЗАН-АЛЬГИНАТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ОЦЕНКА ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ

Лозицкая О.А., Красноштанова А.А

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия 125047, Москва, Миусская пл, д.9.  
e-mail: aak28@yandex.ru

Определена емкость наночастиц по препарату, исследована динамика высвобождения доксорубицина при значениях pH среды различных отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Исследовано влияние свободного и включенного в наночастицы доксорубицина на активность пищеварительных ферментов.

**Ключевые слова:** хитозан-альгинатные наночастицы, адресная доставка лекарств, доксорубицин, желудочно-кишечный тракт, пищеварительные ферменты

В настоящее время разработка систем адресной доставки лекарственных препаратов представляет повышенный интерес, так как позволяет существенно снизить вероятность побочных реакций организма на медикаментозное воздействие; повысить локальную концентрацию в целевых клетках, что даёт возможность сократить терапевтическую дозу лекарства и кратность его введения [1]. Недостаточная избирательность лекарственных средств особенно актуальна для химиотерапии. Именно препараты, используемые при лечении раковых опухолей, оказывают наиболее негативное воздействие на организм в целом.

В данной работе проведены исследования по разработке носителя на основе природных полимеров углеводной природы, хитозана и альгината, для противоопухолевого антибиотика доксорубицина. Рассмотренные полимеры биосовместимы с тканями организма человека, не вызывают аллергических реакций и отторжения [2]. Полисахаридный гидрогель не подвергается ферментативному расщеплению в верхних отделах желудочно-кишечного тракта и не растворяется в кислой среде желудка. В слабощелочной среде кишечника происходит его медленное растворение, что приводит к высвобождению доксорубицина в тонком кишечнике при практически полном сохранении активности лекарственного препарата [3].

Исследование влияния доксорубицина на активность ферментов желудочно-кишечного тракта показало, что в случае введения в ЖКТ свободного доксорубицина в зависимости от его дозы происходит снижение или увеличение активности ферментов в интервале от 20 до 300%. В случае доксорубицина, включенного в хитозан-альгинатные наночастицы его влияние на активность пищеварительных ферментов существенно снижается.

Увеличения активности доксорубицина возможно достичь путем присоединения к опухолевым маркерам, что позволит произвести адресную доставку препарата. Эти исследования будут проведены в дальнейшем.

Литература:



1. Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Оборин В.А., Девришов Д.А., Копылов С.Н. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы. // Известия Коми научного центра УРО РАН. 2012, с. 46-55.
2. Ильина А. В., Львов А. В., Орлов В.Н., Будашов И.А., Варламов В.П. Получение наночастиц на основе производных хитозана и перспективы их использования. // Прикладная биохимия и микробиология. 2004, Т.41, №1, с. 61-65.
3. Соснов А.В., Иванов Р.В., Балакин К.В., Шоболов Д.Л., Федотов Ю.А., Калмыков Ю.М. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц. // Качественная клиническая практика. 2008 г., №2, стр. 4-12.

UDC: 577.1 51, 577.181.4

## DEVELOPMENT OF THE SYSTEM OF ORAL DELIVERY OF DOXORUBICINE ON THE BASIS OF CHITOSAN-ALGINATE NANOPARTICLES AND EVALUATION OF ITS IMPACT ON THE ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES

Lozitskaya OA, Krasnoshtanova AA

Russian Chemical-Technological University. DI. Mendeleev, Moscow, Russia 125047, Moscow, Miuskaya sq., 9.  
 e-mail: aak28@yandex.ru

The capacity of nanoparticles by the doxorubicin was determined, the dynamics of doxorubicin release at pH values of various parts of the gastrointestinal tract (GIT) was studied. The influence of free and incorporated doxorubicin in the nanoparticle on the activity of digestive enzymes was studied.

**Key words:** chitosan-alginate nanoparticles, targeted drug delivery, doxorubicin, gastrointestinal tract, digestive enzymes.

At present, the development of targeted delivery systems for medicinal products is of great interest, since it makes it possible to significantly reduce the likelihood of adverse reactions of the organism to medication; increase the local concentration in the target cells, which makes it possible to reduce the therapeutic dose of the drug and the frequency of its administration [1]. Insufficient selectivity of medicines is especially important for chemotherapy. It is the drugs used in the treatment of cancer tumors that have the most negative impact on the body as a whole.

In this paper, studies have been carried out to develop a carrier based on natural polymers of carbohydrate nature, chitosan and alginate, for the antitumor antibiotic doxorubicin. The polymers considered are biocompatible with the tissues of the human organism; do not cause allergic reactions and rejection [2].

The polysaccharide hydrogel is not subjected to enzymatic cleavage in the upper sections of the gastrointestinal tract and does not dissolve in the acidic environment of the stomach. In a slightly alkaline environment of the intestine, its slow dissolution occurs, which leads to the release of doxorubicin in the small intestine, while the drug activity is almost completely preserved [3].

A study of the effect of doxorubicin on the activity of gastrointestinal enzymes showed that in the case of the introduction of free doxorubicin in the gastrointestinal tract, depending on its dose, the activity of enzymes decreases or increases in the range from 20 to 300%. In the case of doxorubicin, included in chitosan-alginate nanoparticles, its effect on the activity of digestive enzymes is significantly reduced.

Increasing the activity of doxorubicin can be achieved by attaching to tumor markers, which will allow the targeted delivery of the drug. These studies will be carried out in the future.

### References:

1. Ivonin AG, Pimenov EV, Oborin VA, Devrishov DA, Kopylov SN Directional transport of medicines: the current state of the issue and prospects. // Proceedings of the Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. 2012, p. 46-55.
2. Ilyina AV, Lvov AV, Orlov VN, Budashov IA, Varlamov VP Obtaining nanoparticles based on chitosan derivatives and prospects for their use. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2004, T.41, No. 1, p. 61-65
3. Sosnov AV, Ivanov RV, Balakin KV, Shobolov DL, Fedotov Yu.A., Kalmykov Yu.M. Development of drug delivery systems using micro- and nanoparticles. // Qualitative clinical practice. 2008, No. 2, pp. 4-12.
4. Fedosov P.A. Chitosan as a polymer of the future and prospects of its use in medicine. // APRIORI. Series: Natural and technical sciences. 2014, No. 4, p.
5. Molchanov V.P. Preparation of poly-capsules based on chitosan and salts of alginic acid for encapsulating phospholipid micelles. // Vestnik MITHT, 2010, v.5, No. 2, p.

УДК 576.53

## РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ УСТАНОВКИ АНАЛИЗА ТРАЕКТОРИЙ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ СУБМИКРОННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Седенков П.Н.<sup>1</sup>, Курьяков В.Н.<sup>2</sup>, Сафонов А.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный педагогический университет, Институт биологии и химии, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт проблем нефти и газа РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт физической химии и электрохимии РАН, Москва, Россия

pavel.sedenkov@yandex.ru

В работе представлена разработанная авторами лабораторная установка, позволяющая проводить измерения методом NTA. Также представлены результаты измерения размеров эталонных образцов наночастиц.

**Ключевые слова:** наночастицы, бактерии, ультрамикроскопия, анализ траекторий частиц

Используя оптическую схему ультрамикроскопа можно наблюдать за движением субмикронных биологических объектов (в первую очередь бактериальных клеток) и наночастиц размером до 20-30 нм. В методе ультрамикроскопии анализируются не сами частицы, а рассеянный на объектах свет лазерного излучения, что позволяет избежать ограничений, связанных с дифракционным пределом. Суть принципа анализа траекторий частиц (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) заключается в измерении среднего квадрата смещения нано- и субмикронных частиц в жидкости за определенное время, оценка их гидродинамического радиуса с помощью формулы Эйнштейна-Стокса.

Большинство субмикронных биологических объектов обладают способностью совершать направленное движение за счет работы органоидов движения и, за счет этого их треки принципиально отличаются от треков объектов, не обладающих способностью двигаться самостоятельно. В данной работе метод NTA использован для создания возможности дифференцировки живых и неживых объектов в системе. При этом задачами работы является получение таких параметров бактериальных клеток, как: средняя скорость, траектория движения и концентрация.

В работе представлена разработанная авторами лабораторная установка, позволяющая проводить измерения методом NTA. Также представлены результаты измерения размеров эталонных образцов наночастиц, которые были также измерены другими экспериментальными методами.

UDC 576.53

## DEVELOPMENT AND APPLICATION OF EXPERIMENTAL SETUP FOR NANOPARTICLE TRACKING ANALYSIS FOR RESEARCH OF SUBMICRON BIOLOGICAL OBJECTS

Sedenkov P.N.<sup>1</sup>, Kuryakov V.N.<sup>2</sup>, Safonov A.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Oil and Gas Research Institute of RAS, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of RAS, Moscow, Russia

pavel.sedenkov@yandex.ru

The paper presents a laboratory setup developed by the authors, which makes it possible to carry out NTA measurements. Also results of measurement of sizes of reference samples of nanoparticles are presented.

**Key words:** nanoparticles, bacteria, ultramicroscopy, nanoparticle tracking analysis

Using the ultramicroscope optical scheme, it is possible to observe the motion of submicron biological objects (bacterial cells) and nanoparticles up to 20-30 nm in size. In the ultramicroscopy method, not the particles themselves are analyzed, but the light of the laser radiation scattered at the particles, which avoids the limitations associated with the diffraction limit. The essence of the principle of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) is to

measure the mean square displacement of nano- and submicron particles in a fluid over a certain time, estimate their hydrodynamic radius using the Stokes-Einstein formula. Most submicron biological objects have the ability to perform directed movement due to the work of organoids of movement and, as a result, their tracks fundamentally differ from tracks of Brownian particles. In this paper, the NTA method was used to create the possibility of differentiating living and non-living objects in the system. The task of the work is to obtain such parameters of bacterial cells as: average speed, trajectory and concentration.

The paper presents a laboratory setup developed by the authors, which makes it possible to carry out NTA measurements. Also results of measurement of sizes of reference samples of nanoparticles are presented.

УДК 66:615.014(086.76)

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОКАПСУЛ С АМИНОКИСЛОТОЙ

Лазурина Л.П., Шубина Г.Н.

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск, Россия  
 305010, Курская обл., Курский р-н, п. Юбилейный, ул. Российская, д. 45  
 e-mail: kafbht@yandex.ru

Разработана лекарственная форма микрокапсулы, содержащие кислоту глутаминовую, которые помещали в твердые желатиновые капсулы заводского производства и получали медулы. Показано, что лучшим методом микрокапсулирования является выделение новой фазы.

**Ключевые слова:** кислота глутаминовая, ацетилфталилцеллюлоза, ацетон, масло касторовое, хлороформ.

Глутаминовая кислота играет важную роль в жизнедеятельности организма, участвует в белковом и углеводном обменах, стимулирует окислительные процессы, способствует обезвреживанию и выведению из организма аммиака, повышает устойчивость организма к токсинам. Ее относят к нейромедиаторным аминокислотам, стимулирующим передачу возбуждения в синапсах ЦНС.

В медицинской практике находит применение главным образом при лечении заболеваний ЦНС: эпилепсии, психозов, реактивных состояний, депрессии и др. В педиатрии препарат применяют при задержке психического развития различной этиологии, церебральных параличах, болезни Дауна, полиомиелите [1].

Целью наших исследований явилось разработка технологии микрокапсул – лекарственных препаратов пролонгированного действия.

Микрокапсулы – это мельчайшие частицы твердого или жидкого лекарственного вещества, покрытые оболочкой из полимерного или другого материала. Размер микрокапсулы может колебаться от 1 до 5000 мкм при толщине оболочки от 0,1 до 200 мкм. Содержание действующих веществ обычно составляет 15-98% их массы. Капсулированные лекарства в настоящее время во многих странах мира являются наиболее распространенной лекарственной формой для приема внутрь после таблеток [2,3].

Нами была модифицирована методика получения микрокапсул выделением новой фазы. Мы применили способ выделения новой фазы при добавлении осадителя, т.е. использовали явление разделения на фазы полимерного раствора при введении в него нового компонента-осадителя, который не смешивается с пленкообразователем, но смешивается с растворителем. Кислоту глутаминовую тщательно измельчали и диспергировали вначале в растворе АФЦ, затем в вазелиновом масле, после чего прибавляли хлороформ. Полученные микрокапсулы отделяли от дисперсионной среды, промывали изопропиловым спиртом и высушивали при комнатной температуре 12-14 часов. Микрокапсулы разделяли на четыре фракции - 300, 500, 700 и 1000 мкм, путем просеивания через соответствующие сита.

Таким образом, в результате проделанной работы нами были получены микрокапсулы с включенной кислотой глутаминовой. Полученные микрокапсулы с кислотой глутаминовой помещали в твердые желатиновые капсулы и получали пролонгированную лекарственную форму – медулы, применение которой обеспечивает удобство для больных, так как позволяет сократить число приемов. Микрокапсулы имеют сферическую форму и молочно-белую окраску.

Литература:

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - М. : Новая Волна, 2010. – 1216 с.
2. Постраш Я.В., Хишова О.М. Микрокапсулирование в фармации – современное состояние и перспективы //

*Вестник фармации. - 2010. - № 2. - С. 1-7.*

*3. Шубина Г.Н., Лазурина Л.П. Разработка технологии микрокапсул с метронидазолом / Сб. трудов III Всерос. науч.-практ. конф. с межд. участием : Биотехнология и биомедицинская инженерия, посв. 75-летию КГМУ, Курск, 2010 – С. 157-158.*

UDC 66:615.014(086.76)

## THE DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF MICROCAPSULES WITH THE AMINO ACID

**Lazurina L. P., Shubina G. N.**

*Kursk state medical university, the ministry of health, RF, Kursk, Russia  
45, Rossiyskaya str., township of Yubileyniy, Kursk district, Kursk region, 305010  
e-mail: kafbht@yandex.ru*

Developed medicinal form of the microcapsules containing a glutamic acid which we placed in solid gelatinous capsules of factory production and got medulas. It was shown that the best method of microencapsulation is a new phase separation.

**Key words:** glutamic acid, acetylphtalylcellulose, acetone, castor oil, chloroform.

Glutamic acid plays an important role in the functioning of organism, involves protein and carbo-hydrate exchange, stimulates oxidation processes, contributes to the neutralization and excretion of ammonia, increases resistance of organism to toxins. It belongs to neuromediator amino acids which stimulate the transfer of excitation in synapses of the CNS (Central Nervous System).

In medical practice it is used mainly in the treatment of CNS disorders: epilepsy, psychosis, reactive states, depression etc. In Pediatrics the drug is used in mental function retardation of various etiology, cerebral paralysis, Down syndrome, polio [1].

The aim of our study was development of technology of microcapsules-drugs of the prolonged action.

The microcapsules are very small particles of solid or liquid medicinal substance, coated with polymer or other material. The size of microcapsule can range from 1 to 5000  $\mu\text{m}$  and the shell thickness from 0.1 to 200  $\mu\text{m}$ . The content of active substances is usually 15-98% of their mass. At the present time, encapsulated drugs in many countries of the world are the most common oral medicinal form after tablets [2,3].

We have modified the technique to obtain microcapsules by a separation of a new phase. We applied the method of a new phase separation by adding a precipitator, i.e., we used the phenomenon of phase separation of a polymer solution by the introduction of a new component - the precipitator, which not mix with the film former, but is mixed with the solvent. Glutamic acid was thoroughly crushed and dispersed initially in solution of APC, then in paraffin oil, then the chloroform was added. The obtained microcapsules were separated from the dispersion medium, washed out with isopropyl alcohol and dried at room temperature for 12 -14 hours. Microcapsules were divided into four fractions - 300, 500, 700 and 1000  $\mu\text{m}$ , by sieving through appropriate sieves.

Thus, as result of this work, we obtained microcapsules with the included glutamic acid. The obtained microcapsules with the glutamic acid were placed in hard gelatinous capsules, so we got prolonged dosage form - medulas, which provide convenience for patients, as they allow to reduce the number of receptions. The microcapsules have a spherical shape and milky white colouring.

### References:

1. Mashkovsky M. D. Medicines. - M. : New Wave, 2010. – 1216 p.
2. Postrach Ya. V., Hishova O. M. Microencapsulation in pharmacy – current state and perspectives // Messenger of pharmacy. - 2010. – No. 2. – S. 1-7.
3. Shubina G. N., Lazurina L. P. Development of technology of microcapsules with metronidazole / Digest of articles of the III all-Russia. scientific-practical Conference with international participation : Biotechnology and biomedical engineering, dedicated the 75th anniversary of KSMU, Kursk, 2010 – P. 157-158.

УДК [582.263+57.044]:[59.084+577.127]

## РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ СЕЛЕН-МЕТАЛЛ-ЛИПИДНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ ИЗ ХЛОРЕЛЛЫ (*CHLORELLA VULGARIS* BEIJ.)

Боднар О.И., Ковальская Г.Б., Грубинко В.В.

Тернопольский национальный педагогический университет им. В. Гнатюка  
 46027, Украина, г. Тернополь, ул. М. Кривоноса, 2, кафедра общей биологии и методики обучения естественных дисциплин  
 e-mail: bodnar\_oi@yahoo.com

Изучали влияние селен-хром- и селен-цинк-липидных комплексов, выделенных из *Chlorella vulgaris* Beij. после ее инкубации с солями селена (IV), цинка (II) и хрома (III) на активность антиоксидантных процессов и энергетического метаболизма здоровых крыс.

**Ключевые слова:** микроводоросли, липиды, микроэлементы, метаболизм, крысы.

Известно о высоком содержании в водорослях липидов различных классов, что нами использовано для получения биологически активных веществ – перспективных препаратов пищевого, фармацевтического и косметического назначения [1]. Среди распространенных для активации и регуляции метаболизма биологически активных добавок (БАД) являются водорослевые субстанции, которые могут содержать в своем составе эссенциальные металлы и неметаллы [2, 3]. *Chlorella vulgaris* хорошо известна как традиционный модельный объект для биотехнологически полученных полезных продуктов: белков, липидов, каротиноидов, витаминов и т. д.

При скармливании здоровым крысам крахмальной суспензии с Se-Cr-липидным (1,85 мкг Se, 1,1 мкг Cr) комплексом из *Ch. vulgaris*, в сыворотке крови снижалось содержание средне-молекулярных пептидов (МСМ) – МСМ1 в 1,6 раза, МСМ2 - в 1,4 раза. При этом, у животных по сравнению с контролем также уменьшалось содержание малонового диальдегида и диеновых конъюгатов (на 47% и 55% соответственно), активировались энергетические процессы (увеличивались активность сукцинатдегидрогеназы 60% и цитохромоксидазы на 20%), активировался глутаматдегидрогеназный путь образования глутамата, возрастала активность каталазы (в 2,6 раза) и содержание восстановленного глутатиона (в 1,5 раза). Применение Se-Zn-липидного (0,4 мкг Se, 2,5 мкг Zn) комплекса из хлореллы показало, что у крыс по сравнению с контролем содержание МСМ уменьшалось на 7-36%, содержание ТБК-АП уменьшалось в сыворотке крови на 23%, а активность каталазы и количество восстановленного глутатиона достоверно возрастали соответственно на 47% и 160%. Также выявлено увеличение активности СДГ на 32,2% и ЦО на 25,2% и уменьшение соотношения НАД-ГДГ / НАДФ-ГДГ, что свидетельствует о активизации синтетического звена азотного метаболизма.

Проведенные исследования показали положительное влияние липидных веществ из *Chlorella vulgaris*, обогащенных микроэлементами в условиях аквакультуры при инкубации клеток водоросли в среде, содержащей соли селена, цинка и хрома, на метаболические процессы в здоровом организме и открывают перспективу их использования в качестве антиоксидантов и антигипоксантов.

Литература:

1. Abd El B., El-Baroty G.S. Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances // *Journal of Aquatic Science*. 2013. Vol. 1, № 1. P. 11-23.
2. Bodnar O.I., Lukashiv O.Ya., Grubihko V.V. Accumulation of chromium and selenium inside cells and in lipids of *Chlorella vulgaris* Beij during the incubation from chromium by sodium chloride and selenite // *International Journal on Algae*. 2017. Vol. 19, Issue 4. P. 357-366.
3. Vinyarska G., Bodnar O., Vasylenko O., Stanislavchuk G. Accumulation and effects of selenium and zinc on *Chlorella vulgaris* Beij. (*Chlorophyta*) metabolism // *Heavy Metals and Other Pollutants in the Environment. Biological Aspects / by ed. G.E. Zaikov*. – Apple Academic Press, 2017. P. 293-315.

UDC [582.263+57.044];[59.084+577.127]

## **METABOLISM REGULATION IN RATS DURING THE EXPERIMENT WITH SELENIUM-METAL-LIPID MEDICATIONS MADE FROM CHLORELLA (CHLORELLA VULGARIS BEIJ.)**

**Bodnar O.I., Koval'ska H.B., Grubinko V.V.**

V. Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ternopil, Ukraine  
46027, Ukraine, Ternopil, M. Krivonis St., 2, TNPU, Department of General Biology and Methods of Teaching Natural Sciences  
e-mail: bodnar\_oi@yahoo.com

We studied the influence of selenium-chromium and selenium-zinc-lipid complexes, allocated from *Chlorella vulgaris* Beij. after its incubation with salts of selenium (IV), zinc (II) and chromium (III), on the activity of antioxidant processes and energy metabolism in healthy rats.

**Key words:** microalgae, lipids, microelements, metabolism, rats.

It is already known about the high content of various lipid classes in algae, and we used these properties to produce biologically active substances – promising agents for dietary, pharmaceutical and cosmetic purposes [1]. Among the common dietary supplements that are used for the metabolism activation and regulation (BAA (biologically active additive)) are algal substances that can contain essential metals and nonmetals in their content. [2, 3]. *Chlorella vulgaris* is a well-known product for the biotechnologically-derived useful products: proteins, lipids, carotenoids, vitamins, etc.

After feeding healthy rats with starch suspension containing Se-Cr-lipid (1.85 µg Se, 1.1 µg Cr) complex from *Chlorella vulgaris*, the content of medium-molecular peptides (MMP) -MMP1 decreased 1.6-times and MMP2-in 1.4 times in the blood serum. In this case, the content of malonic dialdehyde and diene conjugates also decreased in animals (by 47% and 55%, respectively), energy processes were activated (succinate dehydrogenase activity increased by 60% and cytochrome oxidase activity increased by 20%), glutamate dehydrogenase pathway of glutamate activation, increased the catalase activity (2.6 times) and the content of renewed glutathione (in 1.5 times). The use of the Ce-Zn-lipid complex (0.4 µg Se, 2.5 µg Zn) made from *chlorella* showed that the content of MMP decreased by 7-36% in rats compared to the rate in control group, the content of TBA-AP decreased in serum by 23 %, and catalase activity and the amount of renewed glutathione significantly increased by 47% and 160%, respectively. An increase in the activity of SDH by 32.2% and CO for 25.2% and a decrease in the ratio of NAD-GDH / NADP-GDH were also revealed, which indicates the activation of the synthetic link of nitrogen metabolism.

The conducted studies made it possible to show the positive effect of lipid substances made from *Chlorella vulgaris* and enriched with microelements in aquaculture during the incubation of algal cells in a medium containing selenium, zinc and chromium salts on the metabolic processes in a healthy organism and open the prospect of their usage as antioxidants and antihypoxants.

### References:

1. Abd El B., El-Baroty G.S. Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances // *Journal of Aquatic Science*. 2013. Vol. 1, № 1. P. 11-23.
2. Bodnar O.I., Lukashiv O.Ya., Grubihko V.V. Accumulation of chromium and selenium inside cells and in lipids of *Chlorella vulgaris* Beij during the incubation from chromium by sodium chloride and selenite // *International Journal on Algae*. 2017. Vol. 19, Issue 4. P. 357-366.
- Vinyarska G., Bodnar O., Vasylenko O., Stanislavchuk G. Accumulation and effects of selenium and zinc on *Chlorella vulgaris* Beij. (Chlorophyta) metabolism // *Heavy Metals and Other Pollutants in the Environment. Biological Aspects / by ed. G.E. Zaikov. – Apple Academic Press, 2017. P. 293-315.*

УДК 577.112

## РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЭРИТРОПОЭТИН ЧЕЛОВЕКА С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ГЕПАРИН-СВЯЗЫВАЮЩИМ ДОМЕНОМ: СИНТЕЗ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* И ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКА

Карягина А.С.<sup>1,2</sup>, Грунина Т.М.<sup>1</sup>, Н.Б. Поляков<sup>1</sup>, Попонова М.С.<sup>1</sup>, Лящук А.М.<sup>1</sup>, П.А. Орлова<sup>1</sup>, Лунин В.Г.<sup>1,2</sup>, Громов А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия  
 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д.42

e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

Синтезом в клетках *E. coli* получен рекомбинантный эритропоэтин человека, содержащий гепарин-связывающий домен из белка BMP-2. Разработана схема очистки и рефолдинга, позволяющая получить белок в нативной конформации с двумя дисульфидными связями, проявляющий активность *in vitro* и *in vivo*, способный к связыванию с деминерализованным костным матриксом.

**Ключевые слова:** эритропоэтин, гепарин-связывающий домен, *Escherichia coli*

Целью работы было получение синтезированного в клетках *Escherichia coli* высокоочищенного негликозилированного рекомбинантного эритропоэтина человека, обладающего биологической активностью *in vitro* и *in vivo*, способного эффективно и самопроизвольно связываться с деминерализованным костным матриксом (ДКМ). Иммуобилизованный на ДКМ эритропоэтин планируется в дальнейшем использовать в экспериментах по восстановлению дефектов костной ткани как в виде самостоятельного имплантируемого материала, так и совместно с другими индукторами роста кости. Для получения способного к связыванию с ДКМ варианта эритропоэтина в клетках *Escherichia coli* был проклонирован синтетический ген, кодирующий слитный белок HBD-EPO, состоящий из последовательности эритропоэтина человека (EPO), к N-концу которой присоединен гепарин-связывающий белковый домен (HBD) из фактора роста костной ткани BMP-2. Была разработана схема выделения, очистки и рефолдинга белка HBD-EPO, которая позволила получить высокоочищенный белок HBD-EPO. С помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрического анализа было продемонстрировано наличие в белке двух дисульфидных связей, соответствующих нативной укладке белковой цепи. На приведенной электрофореграмме видно, что очищенный белок с добавлением (1) и без добавления (2) восстанавливающего агента (ДТТ) имеет различную подвижность при электрофорезе в ПААГ. Не обработанный ДТТ белок (2) с двумя S-S-связями в молекуле имеет более компактную конформацию и, соответственно, большую подвижность. Полученный белок обладал биологической активностью как *in vitro* на культуре клеток, так и в *in vivo* тесте при подкожном введении препарата мышам с последующим подсчетом количества ретикулоцитов в крови, однако, показанная активность была более чем на порядок меньше, чем активность коммерческого, получаемого в эукариотических клетках, препарата Эпостим (Фармапарк, Россия). Присутствие в молекуле белка гепарин-связывающего домена обеспечивает гепарин-связывающие свойства белка, позволяющие, в частности, в качестве одной из стадий выделения использовать хроматографическую очистку на гепарин-сефарозе, а также самопроизвольного связываться с ДКМ, часто используемым в качестве носителя для регенерации костной ткани. Для количественной оценки концентрации негликозилированного эритропоэтина в растворе нами разработан сэндвич-ИФА тест, основанный на использовании полученной в работе кроличьей поликлональной сыворотки и коммерческих моноклональных антител к эритропоэтину. Данные по связыванию HBD-EPO с ДКМ и оценке выхода из матрикса свидетельствуют о возможности использования этого белка для местного введения в экспериментах по изучению влияния эритропоэтина на процессы регенерации костной ткани.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 16-15-00133).

UDC 577.112

## RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN WITH ADDITIONAL HEPARIN-BINDING DOMAIN: SYNTHESIS IN ESCHERICHIA COLI CELLS AND PROTEIN CHARACTERISTICS

Karyagina A.S. <sup>1,2,3</sup>, Grunina T.M. <sup>1</sup>, Polyakov N.B. <sup>1</sup>, Poponova M.S. <sup>1</sup>, Lyashchuk A.M. <sup>1</sup>, Orlova P.A. <sup>1</sup>, Lunin V.G. <sup>1,3</sup>, Gromov A.V. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

123098, Moscow, Gamalei st., 18

<sup>2</sup> Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia  
119991, Moscow, Khokhlova st., 40

<sup>3</sup> All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia  
127550, Moscow, Timiryazevskaya st., 42  
e-mail: alexander.v.gromov@gmail.com

A recombinant human erythropoietin, containing the heparin-binding domain from the BMP-2 protein, was synthesized in *E. coli*. A purification and refolding scheme has been developed allowing to obtain a protein in a native conformation with two disulfide bonds, exhibiting activity *in vitro* and *in vivo* and capability of binding to a demineralized bone matrix.

**Key words:** erythropoietin, heparin-binding domain, *Escherichia coli*.

The aim of the work was to obtain a highly purified, non-glycosylated recombinant human erythropoietin synthesized in *Escherichia coli*, which has biological activity *in vitro* and *in vivo* and capability of efficiently and spontaneously binding to demineralized bone matrix (DBM). Erythropoietin immobilized on DBM is planned to be used in further experiments on bone tissue regeneration as an independent implantable material, as well as simultaneously with other bone growth factors.

A synthetic gene encoding a HBD-EPO fusion protein consisting of sequences of human erythropoietin (EPO) and the heparin-binding protein domain (HBD) from Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) attached to the N-terminus, was transformed into *Escherichia coli* to obtain a recombinant human erythropoietin with the DBM-binding property. A scheme for the isolation, purification and refolding of the HBD-EPO protein was developed, which allowed to obtain a highly purified HBD-EPO protein. The presence of two disulfide bonds in the protein corresponding to the native structure of protein was demonstrated using MALDI-TOF-mass spectrometric analysis. The figure above shows that the purified protein with addition (1) and without addition (2) of a reducing agent (DTT) has a different mobility in PAGE electrophoresis. The untreated DTT protein (2) with two S-S bonds in the molecule has a more compact conformation and greater mobility, correspondingly. The resulting protein possessed biological activity both *in vitro* on cell culture and *in vivo* in the test with subcutaneous administration of the protein to mice, followed by counting the number of reticulocytes in the blood. However, the shown activity was about 5-10 times less than the activity of Epoetin beta (Epostim) obtained in eukaryotic cells which was purchased from Pharmapark (Russia). The presence of heparin-binding domain provides heparin-binding properties of the protein, allowing to use chromatographic purification on heparin-sepharose as one of the stages of isolation, as well as spontaneous binding to the DBM, often used as a carrier for bone tissue regeneration. To quantify the concentration of non-glycosylated erythropoietin in the solution, we developed a sandwich ELISA test based on the use of the obtained in this work rabbit polyclonal serum and commercial monoclonal antibodies to erythropoietin. Data on HBD-EPO binding to DBM and evaluation of release from the matrix indicate the possibility of using this protein for local administration in experiments to study the effect of erythropoietin on bone regeneration.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 16-15-00133).



УДК: 66.022.1:537.52:66.021.3

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССА СУШКИ БИОМАТЕРИАЛОВ МЕТОДАМИ ТЕРМОВЛАГОМЕХАНИКИ С ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКОЙ

И.А.Шорсткий

ФГБОУ ВО "КубГТУ", Россия, 350000, Краснодар, Красная, 135, thegector@mail.ru, +79676525881

В процессе сушки биоматериалов кроме энергетических затрат важными являются факторы, затрагивающими безопасность и качество продукта, которые являются функцией состояния (температура, влажность, и состав) материала. Особенностью биоматериалов является требование получить равномерное распределение получаемых распределений влажности и температуры внутри биоматериала, при этом необходимо сохранение целостности материала, а при определенных условиях наоборот бывает необходимость разрушить материал. Для понимания базовых механизмов и эффектов применения предварительной обработки импульсным электрическим полем к процессам сушки биоматериалов разработана модель переноса, теоретически описан процесс и проведена экспериментальная проверка управления процессом электропорации биоматериала.

**Ключевые слова:** электрофизическая обработка, импульсное электрическое поле; массообменные процессы; биоматериал; индекс вскрытых клеток, модель, массоперенос.

Теория деформации во влажных и ненасыщенных пористых средах была развита в работе [4]. Дальнейшее расширение теории на многофазный транспорт с использованием описания смесей выполнено в различных исследованиях (обзор в работе [23]). Возможно описание процесса в микромасштабе или с учетом усреднения в макромасштабе [28]. В обоих подходах базовые соотношения могут быть написаны или на основе опытных данных или на основе второго закона термодинамики через неравенство энтропии (неравновесной термодинамики). Подробный обзор общего и расхождения, и за и против этих теорий дан в работе [18]. Эта теория широко применялась к непродовольственным материалам, и совершенно недостаточно примеров всестороннего поромеханического подхода для продуктов питания. Большинство существующих моделей переноса в научной литературе о продуктах питания представляют собой подгонку кривых полученных экспериментально [2; 3; 6; 11; 14], или, в немного улучшенной версии, принимают просто теплопроводность для переноса энергии и просто диффузионный перенос для влажности [8; 16; 24; 27; 29]. При этом решаются уравнения нестационарной теплопроводности (или диффузии), которые используются для определения по экспериментальным данным эффективную теплопроводность (или коэффициенты диффузии). Отличающимся является использование для описания переноса с движущейся границей (задача Стефана), что позволяет отследить поверхность раздела жидкость-пар, где происходит внутреннее испарение [5; 9; 10]. При принятии такой модели поверхность раздела жидкость-пар, где все испарение происходит, отделяет полностью насыщенные и абсолютно сухие области продовольственного материала. Подробное описание механизмов переноса в пористых средах включают испарение и произведенный при этом управляемый давлением поток во время обработки интенсивным нагреванием [12; 13; 20; 21; 30]. В работах [1; 25] базируясь на неравновесной термодинамике развили гибридный подход теории смеси к диффузии и, позже, применение теории Flory-Rehner позволило предсказать расширяющее давление, которое действует на перенос влаги в материале [26]. Описание деформации в продовольственных материалах является редким по сравнению с подробным описанием непосредственно переноса. Обычно используются два разных подхода: или экспериментальные данные о сжатии описываются как функция влагосодержания, или аддитивность объемов различных компонентов используется, чтобы предсказать деформацию из данных потерь влажности [15; 19]. Моделирование переноса в непрочных продовольственных материалах как проблема механики твердого тела и решение линейного баланса импульса для твердой матрицы используется редко в продовольственных материалах, хотя этот подход часто используется, чтобы изучить сушку некоторых других материалов, таких как древесина и керамика. Подробный обзор моделей сушки, которые включают эффекты сжатия, представлен работе [15] включая фундаментальные работы [17; 22]. К процессам предварительной подготовки материала к сушке методами электрофизической обработки можно отнести процессы ультразвукового воздействия, СВЧ-обработки и процессы обработки электрическими полями высоких напряжений [31,32], воздействующие на внутреннюю структуру материала за счет градиента температур, потенциала и давления.

С учетом представленной характеристики состояния проблемы в данном исследовании планируется осуществить попытку развить термовлагомеханику сушки биоматериалов на основе систем дифференциальных уравнений тепло- и массопереноса и описания деформаций совместно с предварительной электрофизической обработкой.

В данной работе в процессе разработки модели процесса сушки с предварительной обработкой импульсным электрическим полем в качестве объекта исследований выступал биоматериал - личинки мух. Процесс сушки многих биоматериалов является по существу переносом энергии и влажности в деформируемой пористой среде.

Для решения поставленной задачи использовался метод Бубнова - Галеркина [33-36]. В отличие от классической формулировки в качестве опорных и пробных функций планируется использование ортогональных (на отрезке от -1 до +1) полиномов Лежандра, имеющих стационарные точки на границах интервала ортогональности. Данное условие позволило составить линейную комбинацию этих полиномов, удовлетворяющих граничным условиям, а начальные - определить рассчитав коэффициенты из системы линейных уравнений, полученных при постановке линейной комбинации полиномов Лежандра в начальное условие.

Предварительная обработка импульсным электрическим полем создает дополнительные микропоры на поверхности мембран маслических клеток. Как только выход микропоры сообщается с жидкой фазой в макропоре, начинается процесс диффузии из микропоры в макропору и из нее происходит диффузия во внешнюю среду. Как показано моделью скорость диффузии в макропоре на много больше, чем скорость диффузии в микропоре и поэтому не является лимитирующей стадией.

В работе проведено построение математической модели переноса тепла и влаги в деформируемом биоматериале - личинок мух после электрофизической обработки, представленной в виде импульсного электрического поля. При моделировании была усовершенствована методика решения дифференциальных уравнений на основе совершенствования метода конечных элементов и использовании метода Бубнова - Галеркина.

#### Литература:

1. Achanta, S., 1995. *Moisture Transport in Shrinking Gels During Drying*. Ph.D. Purdue University, Indiana, United States.
2. Ateba, P., Mittal, G.S., 1994. Modeling the deep-fat frying of beef meatballs. *Int. J. Food Sci. Technol.* 29 (4), 429-440.
3. Bengtsson, N.E., Jakobsson, B., Dagerskog Sik, M., 1976. Cooking of beef by oven roasting—study of heat and mass-transfer. *J. Food Sci.* 41 (5), 1047-1053.
4. Biot, M.A., 1965. *Mechanics of Incremental Deformations: Theory of Elasticity and Viscoelasticity of Initially Stressed Solids and Fluids, Including Thermodynamic Foundations and Applications to Finite Strain*. Wiley, New York.
5. Bouchon, P., Pyle, D.L., 2005. Modelling oil absorption during post-frying cooling—I: model development. *Food Bioprocess Technol.* 83 (C4), 253-260.
6. Chau, K.V., Snyder, G.V., 1988. Mathematical model for temperature distribution of thermally processed shrimp. *Trans. ASAE* 31 (2), 608-612.
7. Datta, A.K., 2007. Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. I: problem formulations. *J. Food Eng.* 80 (1), 80-95.
8. Dincer, I., Yildiz, M., 1996. Modelling of thermal and moisture diffusions in cylindrically shaped sausages during frying. *J. Food Eng.* 28 (1), 35-44.
9. Farid, M.M., Chen, X.D., 1998. The analysis of heat and mass transfer during frying of food using a moving boundary solution procedure. *Heat Mass Transfer* 34 (1), 69-77.
10. Farkas, B.E., Singh, R.P., Rumsey, T.R., 1996. Modeling heat and mass transfer in immersion frying. 1. Model development. *J. Food Eng.* 29 (2), 211-226.
11. Fowler, A.J., Bejan, A., 1991. The effect of shrinkage on the cooking of meat. *Int. J. Heat Fluid Flow* 12 (4), 375-383.
12. Halder, A., Dhall, A., Datta, A.K., 2007. An improved, easily implementable, porous media based model for deep-fat frying—part I: model development and input parameters. *Food Bioprocess Technol.* 85 (C3), 209-219.
13. Halder, A., Dhall, A., Datta, A.K., 2010. Modeling transport in porous media with phase change: applications to food processing. *J. Heat Transfer—Trans. ASME* 133 (3), 031010.
14. Ikediala, J.N., Correia, L.R., Fenton, G.A., Ben-Abdallah, N., 1996. Finite element modeling of heat transfer in meat patties during single-sided pan-frying. *J. Food Sci.* 61 (4), 796-802.
15. Katekawa, M.E., Silva, M.A., 2006. A review of drying models including shrinkage effects. *Drying Technol.* 24 (1), 5-20.
16. Kondjoyan, A., Rouaud, O., McCann, M.S., Havet, M., Foster, A., Swain, M., Daudin, J.D., 2006. Modelling coupled heat-water transfers during a decontamination treatment of the surface of solid food products by a jet of hot air. I. Sensitivity analysis of the model and first validations of product surface temperature under constant air temperature conditions. *J. Food Eng.* 76 (1), 53-62.
17. Kowalski, S.J., 2000. Toward a thermodynamics and mechanics of drying processes. *Chem. Eng. Sci.* 55 (7), 1289-1304.
18. Lewis, R.W., Shreffler, B.A., 1998. *The Finite Element Method in the Static and Dynamic Deformation and Consolidation of Porous Media*, second ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.
19. Mayor, L., Sereno, A.M., 2004. Modelling shrinkage during convective drying of food materials: a review. *J. Food Eng.* 61 (3), 373-386.
20. Ni, H., Datta, A.K., 1999. Moisture, oil and energy transport during deep-fat frying of food materials. *Food Bioprocess Technol.* 77 (C3), 194-204.
21. Ni, H., Datta, A.K., Torrance, K.E., 1999. Moisture transport in intensive microwave heating of biomaterials: a multiphase porous media model. *Int. J. Heat Mass Transfer* 42 (8), 1501-1512.
22. Perre, P., May, B.K., 2001. A numerical drying model that accounts for the coupling between transfers and solid mechanics. Case of highly deformable products. *Drying Technol.* 19 (8), 1629-1643.
23. Schreffler, B.A., 2002. *Mechanics and thermodynamics of saturated/unsaturated porous materials and quantitative solutions*. *Appl. Mech. Rev.* 55 (4), 351-388.
24. Shilton,

N., Mallikarjunan, P., Sheridan, P., 2002. Modeling of heat transfer and evaporative mass losses during the cooking of beef patties using far-infrared radiation. *J. Food Eng.* 55 (3), 217-222. 25. Singh, P.P., 2002. Effect of Viscoelastic Relaxation on Fluid and Species Transport in Biopolymeric Materials. Ph.D. Purdue University, Indiana, United States. 26. van der Sman, R.G.M., 2007. Soft condensed matter perspective on moisture transport in cooking meat. *A.I.Ch.E. J.* 53 (11), 2986-2995. 27. Wang, L., Singh, R.P., 2004. Finite element modeling and sensitivity analysis of double-sided contact-heating of initially frozen hamburger patty. *Trans. ASAE* 47 (1), 147-157. 28. Whitaker, S., 1977. Simultaneous heat, mass and momentum transfer in porous media: a theory of drying. *Adv. Heat Transfer* 13, 114-203. 29. Williams, R., Mittal, G.S., 1999. Low-fat fried foods with edible coatings: modeling and simulation. *J. Food Sci.* 64 (2), 317-322. 30. Yamsaengsung, R., Moreira, R.G., 2002. Modeling the transport phenomena and structural changes during deep fat frying—part II: model solution and validation. *J. Food Eng.* 53 (1), 11-25. 31. Spigno, G., De Faveri, D.M., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *J. Food Eng.* 93 (2), 210-217. 32. Gujar, J.G., Wagh, S.J., Gaikar, V.G., 2010. Experimental and modeling studies on microwave-assisted extraction of thymol from seeds of *Trachyspermum ammi* (TA). *Sep. Purif. Technol.* 70 (3), 257-264. 33. Шорсткий И.А. Совершенствование процесса экстрагирования масличных материалов на основе применения электрофизического воздействия: дис. ... канд. техн. наук. Краснодар, 2016. 168 с. 34. Аксельруд Г.А., Лысянский В.М. Экстрагирование (система твердое тело – жидкость). Л.: Химия, 1974. 256 с. 35. Шорсткий И.А., Кошевой Е.П. Устройство для экстрагирования сырья: пат. 164195 Российская Федерация. 2016. 2 с. 36. Шорсткий И.А. Формирование многомерных пробных функций метода Галеркина // Известия вузов. Пищевая технология. 2017. № 4. С. 112-116.

**Финансирование:** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-08-00409

UDC 66.022.1:537.52:66.021.3

## IMPROVEMENT OF THE BIOMATERIALS DRYING PROCESS BY THE THERMAL-MECHANICAL METHODS ASSISTED WITH ELECTROPHYSICAL PRE-TREATMENT

I. Shorstkii

Kuban State University of Technology, Russian Federation, 350000, Krasnodar, Krasnaya, 135

In the process of drying biomaterials, in addition to energy costs, factors affecting the safety and quality of the product, which are a function of the state (temperature, humidity, and composition) of the material are important. A special feature of biomaterials is the requirement to obtain an even distribution of the obtained distributions of moisture and temperature inside the biomaterial, while maintaining the integrity of the material, and under certain conditions, the need to destroy the material is reversed. To understand the basic mechanisms and effects of applying pretreatment with a pulsed electric field to the drying of biomaterials, a transport model has been developed, the process is theoretically described and an experimental verification of the control of the electroporation process of the biomaterial has been carried out.

**Key words:** electrophysical treatment, pulsed electric field; mass-exchange processes; biomaterial; index of opened cells, model, mass transfer.

The theory of deformation in moist and unsaturated porous media was developed in [4]. Further expansion of the theory into multiphase transport using the description of mixtures was carried out in various studies (review in [23]). It is possible to describe the process on a microscale or with averaging over a macroscale [28]. In both approaches, the basic relationships can be written either on the basis of experimental data or on the basis of the second law of thermodynamics through the inequality of entropy (nonequilibrium thermodynamics). A detailed survey of the general and discrepancy, and for and against these theories is given in [18]. This theory has been widely applied to non-food materials, and there are quite few examples of a comprehensive food-based approach.

Most of the existing transport models in the scientific literature on food products are fitting curves obtained experimentally [2; 3; 6; eleven; 14], or, in a slightly improved version, simply accept thermal conductivity for energy transfer and simply diffusion transfer for moisture [8; 16; 24; 27; 29]. In this case, the equations of non-stationary heat conduction (or diffusion) are solved, which are used to determine the effective thermal conductivity (or diffusion coefficients) from experimental data. Different is the use for describing the transport with a moving boundary (the Stefan problem), which allows us to trace the liquid-vapor interface where internal evaporation takes place [5; 9; 10]. When this model is adopted, the liquid-vapor interface, where all evaporation occurs, separates the completely saturated and absolutely dry areas of the food material. A detailed description of transport mechanisms in porous media includes evaporation and the pressure-controlled flow produced during this treatment by intense heating

[12; 13; 20; 21; thirty]. In the papers [1; 25] based on nonequilibrium thermodynamics developed a hybrid approach to mixing theory to diffusion and, later, the application of the Flory-Rehner theory allowed predicting the expanding pressure that acts on the moisture transfer in the material [26].

The description of the deformation in food materials is rare in comparison with the detailed description of the transfer itself. Two different approaches are usually used: either the experimental data on compression are described as a function of moisture content, or the additivity of the volumes of the various components is used to predict the deformation from the moisture loss data [15; 19]. The modeling of transport in fragile food materials as a problem of solid mechanics and the solution of linear momentum balance for a solid matrix is rarely used in food materials, although this approach is often used to study the drying of some other materials such as wood and ceramics. A detailed review of the drying models, which include compression effects, is presented in [15] including the fundamental papers [17; 22]. To processes of preliminary preparation of a material for drying by methods of electrophysical processing it is possible to carry processes of ultrasonic influence, microwave processing and processes of processing by electric fields of high stresses influencing the internal structure of a material due to the temperature gradient, potential and pressure.

Taking into account the presented characteristic of the problem state in this research, it is planned to attempt to develop the thermal mechanics of drying the biomaterials on the basis of differential equations of heat and mass transfer and deformation description together with preliminary electrophysical processing.

In this paper, in the process of developing a model of the drying process with preliminary treatment of a pulsed electric field, biomaterial-larvae of flies served as a research object. The drying process of many biomaterials is essentially a transfer of energy and moisture in a deformable porous medium.

The Bubnov-Galerkin [33-36] method was used to solve this problem. In contrast to the classical formulation, it is planned to use orthogonal (on the interval -1 to +1) Legendre polynomials having stationary points on the boundaries of the orthogonality interval as support and trial functions. This condition made it possible to compile a linear combination of these polynomials satisfying the boundary conditions, and the initial ones to determine the coefficients from the system of linear equations obtained by setting up a linear combination of Legendre polynomials in the initial condition.

Preliminary treatment with a pulsed electric field creates additional micropores on the surface of the membranes of oil-bearing cells. As soon as the microporous outlet communicates with the liquid phase in the macropores, the process of diffusion from the micropores to the macropores begins and diffusion into the external medium occurs from it. As shown by the model, the diffusion rate in the macropores is much greater than the diffusion rate in the micropores and, therefore, is not a limiting stage.

The mathematical model of heat and moisture transfer in a deformed biomaterial - fly larvae after electrophysical treatment, represented as a pulsed electric field - was constructed in the work. In modeling, the technique of solving differential equations was improved on the basis of improving the finite element method and using the Bubnov-Galerkin method.

#### References:

1. Achanta, S., 1995. *Moisture Transport in Shrinking Gels During Drying*. Ph.D. Purdue University, Indiana, United States.
2. Ateba, P., Mittal, G.S., 1994. *Modeling the deep-fat frying of beef meatballs*. *Int. J. Food Sci. Technol.* 29 (4), 429-440.
3. Bengtsson, N.E., Jakobsson, B., Dagerskog Sik, M., 1976. *Cooking of beef by oven roasting—study of heat and mass-transfer*. *J. Food Sci.* 41 (5), 1047-1053.
4. Biot, M.A., 1965. *Mechanics of Incremental Deformations: Theory of Elasticity and Viscoelasticity of Initially Stressed Solids and Fluids, Including Thermodynamic Foundations and Applications to Finite Strain*. Wiley, New York.
5. Bouchon, P., Pyle, D.L., 2005. *Modelling oil absorption during post-frying cooling—I: model development*. *Food Bioprocess Process.* 83 (C4), 253-260.
6. Chau, K.V., Snyder, G.V., 1988. *Mathematical model for temperature distribution of thermally processed shrimp*. *Trans. ASAE* 31 (2), 608-612.
7. Datta, A.K., 2007. *Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. I: problem formulations*. *J. Food Eng.* 80 (1), 80-95.
8. Dincer, I., Yildiz, M., 1996. *Modelling of thermal and moisture diffusions in cylindrically shaped sausages during frying*. *J. Food Eng.* 28 (1), 35-44.
9. Farid, M.M., Chen, X.D., 1998. *The analysis of heat and mass transfer during frying of food using a moving boundary solution procedure*. *Heat Mass Transfer* 34 (1), 69-77.
10. Farkas, B.E., Singh, R.P., Rumsey, T.R., 1996. *Modeling heat and mass transfer in immersion frying. 1. Model development*. *J. Food Eng.* 29 (2), 211-226.
11. Fowler, A.J., Bejan, A., 1991. *The effect of shrinkage on the cooking of meat*. *Int. J. Heat Fluid Flow* 12 (4), 375-383.
12. Halder, A., Dhall, A., Datta, A.K., 2007. *An improved, easily implementable, porous media based model for deep-fat frying—part I: model development and input parameters*. *Food Bioprocess Process.* 85 (C3), 209-219.
13. Halder, A., Dhall, A., Datta, A.K., 2010. *Modeling transport in porous media with phase change: applications to food processing*. *J. Heat Transfer—Trans. ASME* 133 (3), 031010.
14. Ikediala, J.N., Correia, L.R., Fenton, G.A., Ben-Abdallah, N., 1996. *Finite element modeling of heat transfer in meat patties during single-sided pan-frying*. *J. Food Sci.* 61 (4), 796-802.
15. Katekawa, M.E., Silva, M.A., 2006. *A review of drying models including shrinkage effects*. *Drying Technol.* 24 (1), 5-20.
16. Kondjoyan, A., Rouaud, O., McCann, M.S., Havet, M., Foster, A., Swain, M., Daudin, J.D., 2006. *Modelling coupled heat-water transfers during a decontamination treatment of the surface of solid food products by a jet of hot air. I. Sensitivity analysis of the model*

and first validations of product surface temperature under constant air temperature conditions. *J. Food Eng.* 76 (1), 53-62. 17. Kowalski, S.J., 2000. Toward a thermodynamics and mechanics of drying processes. *Chem. Eng. Sci.* 55 (7), 1289-1304. 18. Lewis, R.W., Shreffler, B.A., 1998. *The Finite Element Method in the Static and Dynamic Deformation and Consolidation of Porous Media*, second ed. John Wiley and Sons, Inc., New York. 19. Mayor, L., Sereno, A.M., 2004. Modelling shrinkage during convective drying of food materials: a review. *J. Food Eng.* 61 (3), 373-386. 20. Ni, H., Datta, A.K., 1999. Moisture, oil and energy transport during deep-fat frying of food materials. *Food Bioprocess Technol.* 77 (C3), 194-204. 21. Ni, H., Datta, A.K., Torrance, K.E., 1999. Moisture transport in intensive microwave heating of biomaterials: a multiphase porous media model. *Int. J. Heat Mass Transfer* 42 (8), 1501-1512. 22. Perre, P., May, B.K., 2001. A numerical drying model that accounts for the coupling between transfers and solid mechanics. Case of highly deformable products. *Drying Technol.* 19 (8), 1629-1643. 23. Schreffler, B.A., 2002. Mechanics and thermodynamics of saturated/unsaturated porous materials and quantitative solutions. *Appl. Mech. Rev.* 55 (4), 351-388. 24. Shilton, N., Mallikarjunan, P., Sheridan, P., 2002. Modeling of heat transfer and evaporative mass losses during the cooking of beef patties using far-infrared radiation. *J. Food Eng.* 55 (3), 217-222. 25. Singh, P.P., 2002. *Effect of Viscoelastic Relaxation on Fluid and Species Transport in Biopolymeric Materials*. Ph.D. Purdue University, Indiana, United States. 26. van der Sman, R.G.M., 2007. Soft condensed matter perspective on moisture transport in cooking meat. *A.I.Ch.E. J.* 53 (11), 2986-2995. 27. Wang, L., Singh, R.P., 2004. Finite element modeling and sensitivity analysis of double-sided contact-heating of initially frozen hamburger patty. *Trans. ASAE* 47 (1), 147-157. 28. Whitaker, S., 1977. Simultaneous heat, mass and momentum transfer in porous media: a theory of drying. *Adv. Heat Transfer* 13, 114-203. 29. Williams, R., Mittal, G.S., 1999. Low-fat fried foods with edible coatings: modeling and simulation. *J. Food Sci.* 64 (2), 317-322. 30. Yamsaengsung, R., Moreira, R.G., 2002. Modeling the transport phenomena and structural changes during deep fat frying—part II: model solution and validation. *J. Food Eng.* 53 (1), 11-25. 31. Spigno, G., De Faveri, D.M., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *J. Food Eng.* 93 (2), 210-217. 32. Gujar, J.G., Wagh, S.J., Gaikar, V.G., 2010. Experimental and modeling studies on microwave-assisted extraction of thymol from seeds of *Trachyspermum ammi* (TA). *Sep. Purif. Technol.* 70 (3), 257-264. 33. Shorstkii I.A. Sovershenstvovanie protsessa ekstrahiraniya maslichnykh materialov na osnove primeneniya elektrofizicheskogo vozdeistviya [Improvement of the extraction process of oil-contain materials based on the application of electrophysical influence]: dis. ... kand. tekhn. nauk: 05.18.12 / Shorstkii Ivan Aleksandrovich. - Krasnodar, 2016. - 168 s. 34. Akselrud G.A., Lysyansky V.M. Extrahirovanie (Sistema tverdoe telo-zhidkost) [Extraction (Solid-liquid system)]. - L.: Chemistry, 1974. - 256 p. 35. Shorstkii I.A., Koshevoi E.P. Ustrojstvo dlja jekstrahirovanija syr'ja [Extraction installation]. Patent RF, no. 164195, 2015. 36. Shorstky I.A. Formation of multi-dimensional test functions of the Galerkin method // *Izvestiya Vuzov. Food technology*. 2017. No. 4. P. 112-116.

**Grant:** The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-08-00409

УДК 620.3

## СТАБИЛЬНЫЕ И БИОСОВМЕСТИМЫЕ ТЕРАНОСТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ И РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

Котельникова П.А.<sup>1,2</sup>, Шипунова В. О.<sup>1,2</sup>, Никитин М.П.<sup>1,2</sup>, Деев С.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академик М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, дом 16/10

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный, Россия 141701 МО, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9.  
e-mail: kotelnikova@phystech.edu

Разработан метод модификации магнитных наночастиц с помощью нового рекомбинантного белка Bs-C-Mms6. Показана возможность сборки на поверхности клетки конструкции из модифицированных наночастиц и направляющего белкового модуля, а также стабильность и биосовместимость этих конструкций.

**Ключевые слова:** адресная доставка, магнитные частицы, раковые клетки, магнитотактические бактерии, рекомбинантные белки, тераностика.

Разработка наноструктур для диагностики и терапии приближает нас к персонифицированной медицине. Однако главными сложностями их введения в клиническую практику являются сложная химическая конъюгация, а так же недостаточные биосовместимость и стабильность этих конструкций.

Применение рекомбинантных белков — один из способов создания тераностических агентов. Взаимодействие между бактериальной нуклеазой Барназой и ее ингибитором Барстаром дает основу для создания модульных белковых конструкций. Магнитотактические бактерии используют специальные органеллы —

магнитосомы — для ориентации в магнитном поле. Белок Mms6 участвует в нуклеации магнетита. Ранее было показано, что именно его C-концевой участок отвечает за связывание ионов железа. Мы использовали C-концевой участок Mms6 и Барстар для создания нового рекомбинантного белка слияния Bs-C-Mms6.

Bs-C-Mms6 продемонстрировал способность модификации наночастиц без использования методов химической конъюгации и стабилизировал их в воде и при физиологических условиях. Измерение барназной активности после инкубации с различными концентрациями Bs-C-Mms6 показало, что Bs-C-Mms6 может ингибировать Барназу, а значит сохранил свою активность в рекомбинантном белке. Также было показано, что Bs-C-Mms6 и Барназа могут эффективно связываться и на поверхности клетки. Bs-C-Mms6 и модифицированные им частицы не оказали заметного влияния на выживание эукариотических клеток по результатам МТТ-теста. В работе мы продемонстрировали возможность сборки полной конструкции как в растворе, так и на поверхности эукариотических клеток.

Мы разработали новый метод биомодификации магнитных наночастиц без применения методов химической конъюгации. Метод продемонстрировал потенциал для создания систем для адресной доставки соединений к раковым клеткам.

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80105 «мол\_эв\_а» (модификация наночастиц, работа с клеточными культурами) и финансовой поддержке Российского Научного Фонда в рамках проекта №17-74-20146 (модификация белков, синтез наночастиц).

Работа частично выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.

УДК 620.3

## STABLE AND BIOCOMPATIBLE THERANOSTIC AGENTS BASED ON MAGNETIC NANOPARTICLES AND RECOMBINANT PROTEINS

Kotelnikova P.A.<sup>1,2</sup>, Shipunova V. O.<sup>1,2</sup>, Nikitin M.P.<sup>1,2</sup>, Deyev S. M.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7, Miklukho-Maklaya St., 16/10

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Russia, 141701, Dolgoprudny, Institutskiy per., 9 e-mail: kotelnikova@phystech.edu

A method for modifying magnetic nanoparticles using a new recombinant Bs-C-Mms6 protein has been developed. The possibility of assembling the whole structure of modified nanoparticles and a guiding protein module on the cell surface as well as the stability and biocompatibility of these structures was shown.

**Key words:** targeted delivery, magnetic particles, cancer cells, magnetotactic bacteria, recombinant proteins, theranostics.

Development of nanostructures for diagnostic and therapy brings us closer to the personalized medicine. The main difficulties of their introduction in the clinical practice are complicated chemical conjugation of functional components and lack of biocompatibility and stability of these constructions.

One of the ways to create theranostic agents is the employment of recombinant proteins. Non-covalent protein interaction of bacterial ribonuclease Barnase and its inhibitor Barstar can form the basis of module protein assembling. Magnetotactic bacteria use specialized organelles named magnetosomes to orient in the magnetic field. Mms6 protein is involved in the magnetite nucleating in magnetosomes. It was previously shown that C-terminal region of Mms6 is responsible for binding of ferric ions. We used C-terminal region of Mms6 and Barstar to develop a new recombinant fusion protein Bs-C-Mms6.

Bs-C-Mms6 demonstrated an ability to modify magnetic nanoparticles without chemical conjugation and to stabilize magnetite nanoparticles in water and under physiological conditions. Measurement of the enzymatic activity of Barnase after incubation with different concentrations of Bs-C-Mms6 showed that Bs-C-Mms6 inhibit Barnase activity demonstrating the retention of the functionality of Barstar in the fusion protein. It was also shown Barnase and Bs-C-Mms6 can efficiently assemble on the cells surface. Bs-C-Mms6 and protein-coated nanoparticles did not impact on eukaryotic cell viability according to MTT-test results. In this work, we demonstrated the assembly of the complete structure: DARPIn-Barnase and Bs-C-Mms6 magnetic nanoparticles was demonstrated, in solution and on the surface of eukaryotic cells. In this work we developed a new method of magnetic nanoparticles modification

without any chemical conjugation that demonstrated the potential of the system for cancer cell targeting.

The work was partially supported by Russian Foundation for Basic Research and by the National Intellectual Development Foundation (NIDF) according to the research project №17-34-80105 "mol\_ev\_a" (nanoparticle modification, cell culture) and the Russian Science Foundation grant №17-74-20146 (protein modification, nanoparticle synthesis).

The study was partially performed using equipment provided by the IBCH core facility (СКР IBCH, supported by Russian Ministry of Education and Science, grant RFMEFI62117X0018).

УДК: 615.456.4, ББК: 52.82

## СУСПЕНЗИОННАЯ ФОРМА ВОЛОКНИСТОГО КОМПОНЕНТА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА: СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ, МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Н.В.Калмыкова, И.А.Демьяненко, А.В.Шишкина, Ю.С.Хац, А.П.Суслов

ООО "НИАРМЕДИК ПЛЮС", Россия, 125252, Москва, Авиаконструктора Микояна, 12, info@nearmedic.ru, 8499-741-49-89

Получена новая суспензионная форма измельченного очищенного внеклеточного матрикса. Показаны особенности методики ее изготовления. С применением различных методов микроскопии исследованы особенности структуры нового материала. Обсуждены возможные области применения данной формы.

**Ключевые слова:** внеклеточный матрикс, суспензия, волокна, репарация, коллаген

Медицинские изделия, структурной основой которых служит децеллюляризованный (бесклеточный) внеклеточный матрикс (ВКМ), находят широкое применение в современной пластической и реконструктивной хирургии [1,2]. Зачастую при хирургическом лечении ряда патологий, в первую очередь в урологии и отоларингологии, а также при коррекции возрастных и эстетических изменений в косметологии, необходимо применение инъекционных форм биосовместимых пластических материалов. Их используют как для замещения утраченной механической функции тканей, так и для активации репаративных процессов, приводящих к новообразованию аутологичных тканей. С целью создания такого биосовместимого медицинского изделия была разработана новая инъекционная форма внеклеточного матрикса. Децеллюляризованный ВКМ (дВКМ) получали из кожи быка домашнего *Bos taurus taurus* путем щелочной обработки с добавлением солей для уменьшения набухания [3]. Отмывали дистиллированной водой до достижения pH смыва нейтральных значений. Для оценки успешности удаления клеточных компонентов, спектрофлуориметрически оценивали содержание остаточной дцДНК, которое составило менее 15 нг/мг сухой массы. дВКМ измельчали на режущей мельнице (FRITSCH, Германия) и гомогенизировали в диспергаторе (КА, Германия) в стерильной жидкой среде. Было подобрано оптимальное сочетание циклов гомогенизации/перемешивания, позволяющее добиться равномерного распределения волокон фибриллярного компонента внеклеточного матрикса в дисперсионной среде [4]. Полученную суспензию дегазировали и асептически упаковывали в полипропиленовые шприцы. Исследование новой инъекционной формы методом световой микроскопии выявило, что основным её компонентом являются волокна толщиной ~ 20 мкм и длиной ~ 200 мкм. Также изготовленная форма была изучена методом атомно-силовой микроскопии. Было показано, что волокна матрикса имеют складчатую структуру, а на изображениях, обработанных фильтром Собеля, видно, что они состоят из параллельно ориентированных фибрилл коллагена с диаметром около 200 нм. Также выявлено, что часть фибрилл в составе волокна утрачивает параллельную укладку. Таким образом, была разработана и исследована суспензионная форма измельченного дВКМ, применение которой позволит без нанесения разреза, производить её инъекционное введение в необходимую область и легко заполнять открытый раневой дефект различных тканей. Данную форму можно применять в дерматологии и косметологии с целью лечения острых и длительно незаживающих ран кожи, коррекции атрофических рубцов и морщин; в урологии с целью лечения недержания мочи и везико-уретрального рефлюкса; в отоларингологии с целью пластики голосовых связок; в реконструктивной хирургии с целью механического замещения дефектов различных тканей. Также суспензионная форма, полученная в данной работе, может быть использована в качестве гемостатического средства и субстрата для трансплантации клеток в тканевой инженерии.

Была разработана и исследована суспензионная форма измельченного дВКМ, применение которой позволит без нанесения разреза, производить её инъекционное введение в необходимую область и легко заполнять открытый раневой дефект различных тканей.

Литература:

1. Chattopadhyay S., Raines R.T. Collagen-based biomaterials for wound healing // *Biopolymers*. 2014. Vol. 101(8). P. 821-833.
2. Patino M.G., Neiders M.E., Andreana S., Noble B., Cohen R.E. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry // *J. Oral Implantol*. 2002. Vol. 28(5). P. 220-225.
3. Патент РФ № 2007113962/15, 13.04.2007. Сафоян А.А., Нестеренко С.В., Нестеренко В.Г., Алексеева Н.Ю. Биорассасываемая коллагеновая матрица, способ ее получения и применения // Патент России № 2353397. 2009. Бюл. № 12.
4. Патент РФ № 2016141560, 24.10.2016. Сафоян А.А., Суслов А.П., Нестеренко В.Г., Нестеренко С.В., Калмыкова Н.В., Демьяненко И.А., Сорокин О.В. Способ получения суспензионной формы децеллюляризованного внеклеточного матрикса // Патент России №2627844. 2017. Бюл. № 23.

UDC 615.456.4, BBC52.82

## SUSPENDED FORM OF FIBROUS EXTRACELLULAR MATRIX: METHOD FOR PRODUCING, MICROSCOPIC EXAMINATION

**N.Kalmykova, I.Demyanenko, A.Shishkina, Y.Khats, A.Suslov**

LLC "NEARMEDIC PLUS@, Russia, 125252, Moscow, Aviakonstruktora Mikoyana, 12

A novel suspension form of micronized purified extracellular matrix was obtained. The utilized manufacturing technique is presented. With the application of various microscopy methods, structural features have been studied. The fields of application are discussed.

**Key words:** extracellular matrix, suspension, fibers, repair, collagen

Medical devices based on a decellularized (acellular) extracellular matrix (ECM) are widely used in plastic and reconstructive surgery [1,2]. However, in the surgical treatment of some pathologies, mainly in the field of urology and otolaryngology, as well as in contouring procedures in cosmetology, it is necessary to use injectable dosage forms of biocompatible materials allowing replacement of the lost mechanical function of tissues and activation of reparative processes resulting in formation of autologous tissues. For this purpose, the injectable form of the extracellular matrix was developed. Decellularized ECM (dECM) was obtained from the skin of *Bos taurus taurus* by alkaline treatment with the addition of salts to reduce swelling [3]. Then it was washed with distilled water until the pH reached the neutral value. To assess the removal of cellular components, the content of residual dsDNA was measured spectrofluorimetrically, and was shown to be less than 15 ng / mg dry weight. The dECM was ground in a cutting mill (FRITTSCH, Germany) and homogenized in a disperser (IKA, Germany) in a sterile liquid medium. By combining homogenization / stirring cycles, it was possible to obtain a homogeneous suspension of fibers of the fibrillar component of the extracellular matrix [4]. The suspension was degassed and aseptically packaged in polypropylene syringes. A study of the resulting suspension form by light microscopy revealed that fibers with a thickness of ~ 20 µm and a length of ~ 200 µm were the main component of the samples. Atomic force microscopy images of fiber were also obtained. The fibers had a folded structure, and on the images processed by the Sobel filter it was seen that they consisted of parallel oriented collagen fibrils with a diameter of about 200 nm. It was also revealed that part of the fibrils loses parallel folding. Thus, the suspension form of the micronized dECM was developed and investigated, the application of which allows without injection or the incision apply it into the target area and easily fill the open wound defect of various tissues. This form can be used in dermatology and cosmetology, for the treatment of acute and chronic skin wounds, and correction of atrophic scars and wrinkles; in urology, for the treatment of urinary incontinence and vesicoureteral reflux; in otolaryngology, in plastic surgery of the vocal cords; in reconstructive surgery, for mechanical replacement of defects in various tissues. The suspension form prepared according to the present invention also can be used as a hemostatic agent and a substrate for cell transplantation in tissue engineering.

The suspension form of the micronized dECM was developed and investigated, the application of which allows without injection or the incision apply it into the target area and easily fill the open wound defect of various tissues.

References:

1. Chattopadhyay S., Raines R.T. Collagen-based biomaterials for wound healing // *Biopolymers*. 2014. Vol. 101 (8). P. 821-833.
2. Patino M.G., Neiders M.E., Andreana S., Noble B., Cohen R.E. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry // *J. Oral Implantol*. 2002. Vol. 28 (5). P. 220-225.
3. Patent Russian Federation № 2007113962/15, 13.04.2007. Safoyan A.A., Nesterenko S.V., Nesterenko V.G., Alekseeva N.Yu. Bioresorbable collagen matrix, a method for its production and application // Patent of Russia No. 2353397. 2009. Bul. № 12.
4. Patent Russian Federation No. 2016141560, 24.10.2016. Safoyan A.A., Suslov A.P., Nesterenko V.G., Nesterenko S.V., Kalmykova N.V., Demyanenko I.A., Sorokin O.V. Method for the preparation of a suspension form of a decellularized extracellular matrix // Patent of Russia No. 2627844. 2017. Bul. No. 23.



УДК: 546.26:661.183:615.453.3.014.6:619, ББК: 24.124:48.5:52.66

## УГЛЕРОДНЫЕ СОРБЕНТЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ: СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, ПРИМЕНЕНИЕ

М.С.Дроздецкая <sup>1</sup>, Л.Г.Пьянова <sup>1</sup>, Л.К.Герунова <sup>2</sup>, А.В.Седанова <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем переработки углеводов Сибирского отделения Российской академии наук (ИППУ СО РАН), Россия, 644040, Омск, Нефтезаводская, 54, drozdeckaya\_ms87@mail.ru, 89994598951

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», Россия, 644008, Омск, Институтская площадь, 2, gerliud@mail.ru, 83812230531

Разработаны углеродные сорбенты, модифицированные биологически активными веществами. В качестве биологически активных веществ выбраны α-гидроксикислоты – гликолевая и молочная кислоты. Физико-химическими методами изучена полнота протекания процессов модифицирования углеродного сорбента, определены основные характеристики модифицированных образцов. Доказано пролонгированное действие модифицированных сорбентов. Установлено, что сорбент, модифицированный олигомером гликолевой кислоты, обладает выраженным антибактериальным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, их смесей. Сорбент, модифицированный олигомером молочной кислоты, эффективен в отношении бактериально-грибковых ассоциаций. Проведена оценка терапевтической эффективности модифицированных углеродных сорбентов при диарейном синдроме телят.

**Ключевые слова:** углеродный сорбент, гликолевая кислота, молочная кислота, модифицирование, антибактериальные свойства, противогрибковые свойства, диарея, телята.

В настоящее время разработка и применение новых эффективных сорбционных материалов медицинского и ветеринарного назначения представляет значительный научно-практический интерес. В ИППУ СО РАН активно развивается данная область исследований: получение углеродных сорбентов с биоспецифическими свойствами (антибактериальными, противогрибковыми и др.) путем химического модифицирования поверхности биологически активными веществами. Преимущество получаемых материалов: бифункциональность - сочетание адсорбционных свойств исходного углеродного сорбента и биоспецифических свойств нанесенного модификатора. В качестве модификаторов применяют биологически активные вещества, обладающие биоспецифическими свойствами, разрешенные к применению в медицине. Данным требованиям соответствуют α-гидроксикислоты – гликолевая, молочная кислоты [1]. Они нетоксичны и биосовместимы, обладают антибактериальными свойствами, обеспечивают оптимальную кислотность биологических сред, образуют биоразлагаемые олиго-, полимеры [2,3].

Цель данной работы – синтез гранулированных углеродных сорбентов, модифицированных олигомерами гликолевой, молочной кислот, изучение их свойств и терапевтической эффективности при диарейном синдроме телят.

Процесс модифицирования исходного мезопористого углеродного сорбента включает две основные стадии: 1 - пропитка сорбента 50% водным раствором гидроксикислоты в течение 8-24 ч. на воздухе при соотношении сорбент/раствор = 1/2 и температуре 23±2 °С; 2 - поликонденсация при температуре 110-230°С в течение 1-24 ч. [1]. На стадии поликонденсации гидроксикислот происходит закрепление модификаторов на сорбенте в виде соответствующих олигомеров. Нанесенные олигомеры гликолевой, молочной кислот способны к постепенной деструкции в биологических средах до исходных мономеров за счет гидролиза, что сопровождается локальным снижением pH среды. Это обеспечивает пролонгированное высвобождение модификаторов – гликолевой, молочной кислот - в организм, часть гликолевой кислоты участвует в цикле Кребса с образованием углекислого газа и воды, молочной кислоты - в энергетическом обмене клеток (цикл Кори) [2,3].

При модифицировании углеродного сорбента олигомерами гидроксикислот происходит заметное снижение удельной площади поверхности от 377 до 29 м<sup>2</sup>/г и суммарного объема пор от 0,620 до 0,115 см<sup>3</sup>/г, в элементном составе образцов увеличивается содержание кислорода от 1,0 до 15,3 мас. %. В заданных условиях синтеза количество нанесенных на углеродный сорбент олигомеров составляет 12-30 мас. %. В отличие от исходного сорбента при контакте модифицированных сорбентов с физиологическим раствором происходит снижение pH среды от 7,2 до 2,3-3,2 в течение 24 ч.

Стендовые микробиологические испытания *in vitro* показали, что сорбент, модифицированный олиго-

мером гликолевой кислоты, обладает выраженным антибактериальным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий *St. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *Kl. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *E. Coli* и их смесей. Сорбент, модифицированный олигомером молочной кислоты, эффективен в отношении бактериально-грибковых ассоциаций, в частности, «*Staphylococcus aureus* + *Candida albicans*». Биоспецифическое действие модифицированных сорбентов обусловлено кислотно-основными свойствами нанесенных олигомеров гликолевой, молочной кислоты, так как локальное подкисление среды губительно для патогенных микроорганизмов.

Производственные опыты, проведенные в хозяйствах Омской области, доказали высокую терапевтическую эффективность углеродного сорбента, модифицированного олигомером молочной кислоты, при диарейном синдроме телят, обусловленном ассоциацией лактозонегативных эшерихий, протеев, стафилококков и дрожжеподобных грибов рода *Candida*. Применение модифицированного сорбента (доза 300 мг/кг, продолжительность 5 дней) привело к фармакокоррекции гематологических и биохимических показателей крови у больных телят. Клинические признаки диареи были устранены в течение 2-5 дней. Разработанный сорбционный препарат может быть рекомендован для широких производственных испытаний.

#### Литература:

1. P'yanova L.G., Sedanova A.V., Drozdetskaya M.S. Synthesis and research of modified carbon sorbents with hydroxy acids // *Procedia Engineering*. - 2016. - V.152. P. 639 – 646. 2. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* / C. Wang [et al.] // *Food Control*. - 2015. - № 47. - P. 231-236. 3. Волков, А. В. Синтетические биоматериалы на основе полимеров органических кислот в тканевой инженерии / А. В. Волков // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. - 2005. - №2. - С.43-45.

UDC 546.26:661.183:615.453.3.014.6:619, BBC 24.124:48.5:52.66

## CARBON SORBENTS MODIFIED WITH BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES: SYNTHESIS, PROPERTIES, APPLICATION

M.Drozdetskaya <sup>1</sup>, L.P'yanova <sup>1</sup>, L.Gerunova <sup>3</sup>, A.Sedanova <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Hydrocarbons Processing of Siberian Branch Russian Academy of Sciences (IHP SBRAS), Russia, 644040, Omsk, Neftezhavodskaya, 54

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin", Russia, 644008, Omsk, Institutskaja Square, 2

Carbon sorbents modified with biologically active substances have been developed. The biologically active substances are represented by  $\alpha$ -hydroxy acids (glycolic and lactic acids). Physicochemical methods were used to study the completeness of the process of carbon sorbent modification, the main characteristics of the modified sorbents were estimated. The prolonged action of the modified sorbents was demonstrated. It was found that the sorbent modified with a glycolic acid oligomer showed the high antibacterial action to Gram-positive and Gram-negative bacteria or mixtures thereof. The sorbent modified with a lactic acid oligomer demonstrated the efficiency to bacterial-fungal associations. Therapeutic potency assignment of the modified carbon sorbents with diarrhoeal syndrome of calves was carried out.

**Key words:** carbon sorbent, glycolic acid, lactic acid, modification, antibacterial properties, antifungal properties, scour, calves

At the present time the development and application of new sorption materials for medical and veterinary prescription are of great science-practical interest. The indicated research area is being developed at the Institute of Hydrocarbons Processing SB RAS: synthesis of the carbon sorbents with biospecific properties (antibacterial, antifungal etc.) by chemical modification of the surface with biologically active substances. Advantage of the obtained materials: bifunctionality - compatibility of the carbon sorbent adsorption properties and biospecific properties of the applied modifier. The modifiers are represented by biologically active substances with biospecific properties that are approved for use in medicine.  $\alpha$ -Hydroxy acids (glycolic and lactic acids) meet these requirements [1]. They are biocompatible and non-toxic and have antibacterial properties. These acids ensure optimal acidity of biological media and form biodegradable oligomers and polymers [2,3].

The goal of this work was to synthesize granular carbon sorbents modified with oligomers of glycolic or lactic acids and investigate their properties and therapeutic potency with diarrhoeal syndrome of calves.

The process of initial mesoporous carbon sorbent modification includes two main stages: 1) impregnation of a carbon sorbent with aqueous solutions of hydroxy acid of 50% concentration at a sorbent to hydroxy acid solution

ratio of 1:2 (by weight) under static conditions at a temperature of 21-25°C for 8-24 hours, and 2) polycondensation of the impregnated samples at 110-230°C for 1-24 h [1]. The modifiers are fixed on the sorbent at the stage of polycondensation with the formation of appropriate oligomers. In the biological media oligomers of glycolic or lactic acids deposited on the carbon sorbent are capable of gradual degradation due to the hydrolysis to monomers which is accompanied by a decrease pH of the medium. This ensures prolonged release of modifiers (glycolic or lactic acid) into the body, part of glycolic acid participates in the Krebs cycle with the formation of carbon dioxide and water, lactic acid participates in the energy metabolism of cells (Cori cycle) [2,3].

It was found that modification of the carbon sorbent with a hydroxy acid oligomers leads to a significant reduction in the specific surface area from 377 to 29 m<sup>2</sup>/g and total pore volume from 0,620 to 0,115 cm<sup>3</sup>/g, increases the oxygen content in the elemental composition from 1.0 to 15.3%. Under these synthesis conditions the amount of deposited hydroxy acid oligomers is 12-30%. In contrast to the initial sorbent, after contacting the modified sorbents with saline solution the pH of the medium decreased from 7.2 to 2.3-3.2 for 24 hours.

In vitro bench microbiological tests showed that the sorbent modified with a glycolic acid oligomer has antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria *St. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *Kl. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *E. Coli* and mixtures thereof. The sorbent modified with a lactic acid oligomer demonstrated the efficiency to bacterial-fungal associations such as cultures *St. aureus* + *C. albicans*. The biospecific action of the modified sorbents is due to the acid-base properties of the deposited oligomers of glycolic or lactic acids, since local acidification of the medium is pernicious for pathogenic microorganisms.

Farm scale trials of the modified sorbents were carried out on farms of the Omsk region. It was found that the sorbent modified with a lactic acid oligomer showed the highest therapeutic potency with diarrhoeal syndrome of calves caused by the associations of lactose negative *Escherichia*, *Proteus*, *Staphylococcus* and yeast-like fungi of the genus *Candida*. The use of the modified sorbent (dose 300 mg/kg for 5 days) led to pharmacocorrection of hematologic profile and biochemical blood assay of diseased calves. The clinical features of diarrhea were eliminated within 2-5 days. The developed sorption preparation can be recommended for wide production trials.

#### References:

1. P'yanova L.G., Sedanova A.V., Drozdetskaya M.S. Synthesis and research of modified carbon sorbents with hydroxy acids // *Procedia Engineering*. - 2016. - V.152. P. 639 – 646.
2. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* / C. Wang [et al.] // *Food Control*. - 2015. - № 47. - P. 231-236.
3. Volkov, A. V. Sinteticheskie biomaterialy na osnove polimerov organicheskikh kislot v tkanevoj inzhenerii / A. V. Volkov // *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya*. - 2005. - №2. - S.43-45.

УДК 547.816.3; 615.014.67

## УЛУЧШЕНИЕ ДЕСОРБЦИИ ФУРОКУМАРИНОВ В ВОДНЫЙ РАСТВОР ПОСЛЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА CaCO<sub>3</sub> С ЛИЗОЦИМОМ И НАНОЧАСТИЦАМИ МАГНЕТИТА

Смирнова О.Д., Паламарчук К.В., Калашникова И.В., Камышинский Р.А., Букреева Т.В.

Национальный исследовательский центр «Курчатовский Институт», 123098, Москва, пл. Академика Курчатова, 1; +7(926)785-22-38; kvp1239@mail.ru

Проведена иммобилизация смеси трёх фурукумаринов растительного происхождения: изопимпинеллина, бергаптена и ксантотоксина – на частицах соосаждения ватерита CaCO<sub>3</sub> с лизоцимом и наночастицами магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и исследована сравнительная десорбция в водные растворы при различных pH. Показано улучшение десорбции кумаринов более чем в 30 раз.

**Ключевые слова:** кумарины, ватерит, лизоцим, наночастицы

Фурукумарины известны как противоопухолевые и иммуностимулирующие препараты, ингибирующие цитохром CYP3A4 и обладающие спазмолитической и фотодинамической активностью. Их применимость затруднена плохой растворимостью в водных средах и неполярных растворителях [1]. Хорошим растворителем для фурукумаринов является диметилсульфоксид (ДМСО) [1,2], в котором они растворяются до 0,15 массовых долей при 25 °С, но до сих пор такие композиции еще не нашли применения в медицине. Необходимость улучшения растворимости в водных средах актуальна для препаратов фурукумаринов [1-3].

В работе использована смесь трёх фурукумаринов: изопимпинеллина, бергаптена и ксантотоксина

(ФГБНУ ВИЛАР [3]), получаемая из *Ammi majus* L. и представляющая собой сухой порошок желтого цвета с размером частиц 20-120 мкм (частицы 1). В предыдущих исследованиях нами было выявлено, что включение лизоцима в состав CaCO<sub>3</sub>-частиц способно улучшать десорбцию иммобилизованных препаратов [4]. Проведена адсорбция растворённой в ДМСО смеси кумаринов на частицах, полученных соосаждением лизоцима с CaCO<sub>3</sub> (частицы 2), а также соосаждение кумаринов с наночастицами (5-50нм) магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ватерита CaCO<sub>3</sub> и лизоцима (частицы 3). Частицы подвергались лиофильной сушке. Изображения частиц, полученные при помощи сканирующей электронной микроскопии, представлены на рис 1.

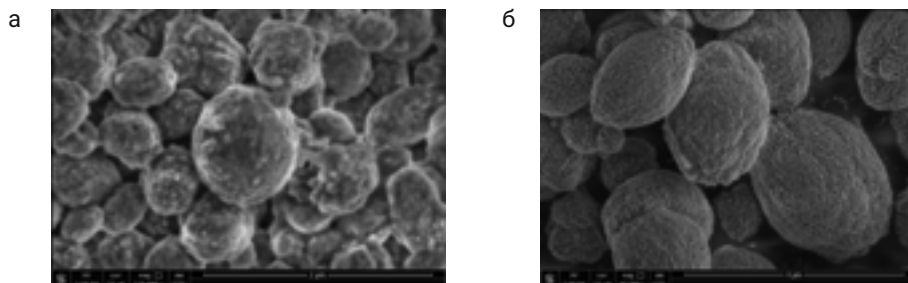


Рисунок 1. СЭМ-изображения частиц 2 (а) и частиц 3 (б).

Содержание кумаринов в частицах определялось спектрофотометрически в диапазоне от 235 до 380 нм. В результате было вычислено, что частицы 2 содержали 0,011 массовых долей фурукумаринов, а частицы 3 – 0,168 массовых долей. Аналогично вычислялись количества десорбированных из частиц кумаринов при экспозиции в водных растворах 1 к 10 по весу (рис. 2).

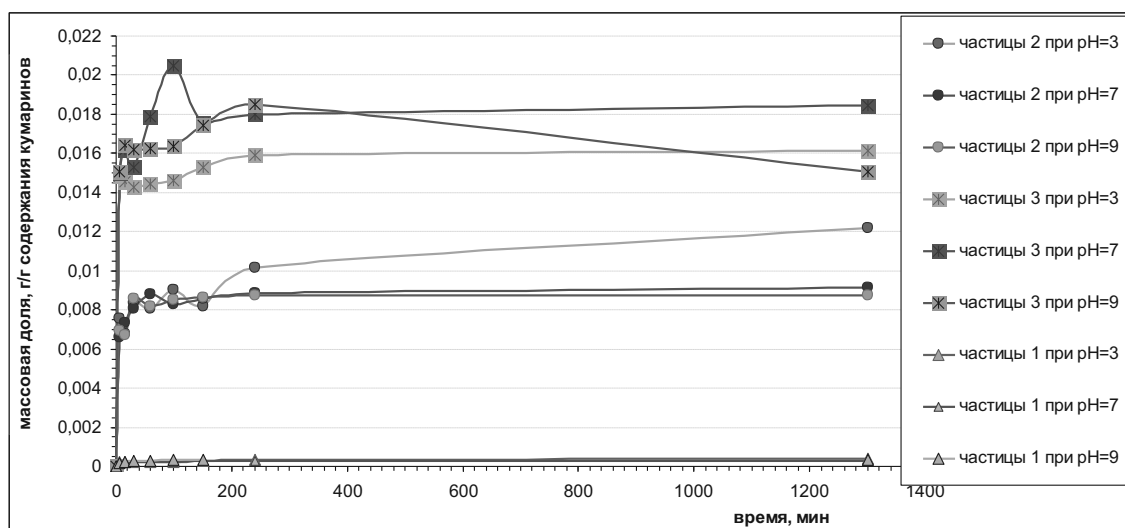


Рисунок 2. Сравнительная кинетика десорбции кумаринов.

Литература:

1. Ложкин, А.В., Саканян Е.И. / Природные кумарины: методы выделения и анализа // Хим. - фарм. журн. - 2006. - Т.40. - №6, с. 47-49.
2. Кузнецова Г.А./ Природные кумарины и фурукумарины.// Ленинград: 1967. - 248 с.
3. Крутов П. В., Громакова А. И., Сайбель О. Л./ Совершенствование технологии получения фурукумаринов из плодов Амми большой (*Ammi majus* L.)// Фармацевтические науки 2014 -VIII, с. 54-56.
4. Марченко И.В., Смирнова О.Д., Калашникова И.В., Букреева Т.В./ Использование лизоцима как структурной составляющей частиц ядро-оболочка на основе CaCO<sub>3</sub>// Acta Naturae - 2017, - Т.9 - № 5, с. 173-174.

UDC 547.816.3; 615.014.67

## IMPROVEMENT OF FUROCUMARINS DESORPTION OF IN AQUEOUS SOLUTION AFTER THEIR IMMOBILIZATION ONTO CaCO<sub>3</sub> WITH LYSOZYME AND MAGNETITE NANOPARTICLES

Smirnova O.D., Palamarchuk C.V., Kalashnikova I.V., Kamyshinsky R.A., Bukreeva T.V.

National Research Center «Kurchatov Institute»; 1, Akademika Kurchatova pl., Moscow, 123182, Russia; +7(926)785-22-38; kvp1239@mail.ru

Immobilization of a mixture of three natural furocoumarins (isopimpinellin, bergapten and xanthotoxin) onto particles prepared by coprecipitation of vaterite, lysozyme and magnetite nanoparticles was performed. A comparative desorption of immobilized substances into aqueous solutions was investigated at various pH. Improvement of coumarins desorption is shown by more than 30 times.

**Key words:** furocoumarins, vaterite, lysozyme, nanoparticles

Furanocoumarins are known as antitumor and immunostimulatory drugs, which have antispasmodic and photodynamic activity with the inhibitory effect on CYP3A4. The applicability of furanocoumarins is greatly hampered by the poor solubility in water and some non-polar solvents [1]. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is an appropriate solvent for furanocoumarins [1,2]; in this case, its solubility is 15 % mass at 25 °C. But such compositions are not widely applied in medicine. The need for reducing toxic impact by improving water solubility of coumarin drugs is relevant for furocoumarins from plant raw materials [1-3].

We used a mixture of three furocoumarins: isopimpinellin, bergapten and xanthotoxin (VILAR [3]), derived from the Ammi majus L., a dry yellow powder with particle size of 20-120 microns (particles 1). In previous studies we found that the inclusion of lysozyme into CaCO<sub>3</sub> particles improves desorption of immobilized substances [4]. Adsorption of dissolved coumarins mixture in DMSO on particles prepared by co-precipitation of lysozyme with CaCO<sub>3</sub> was performed (particle 2). Also, a co-precipitation of coumarins with nanoparticles (5-50 nm) magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> (vaterite) and lysozyme was conducted (particles 3). The particles were lyophilized. Particles SEM-images are presented in Fig. 1.

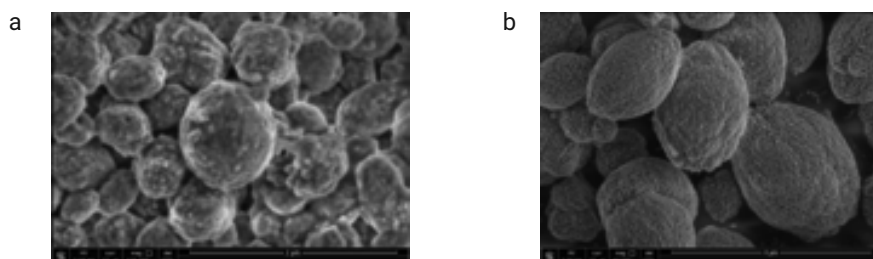


Figure 1. SEM-images of particles 2 (a) and 3 (b).

The amount of coumarins in particles was determined by spectrophotometry in the range of 235-380 nm. It was found, that particles 2 contained 1,1 mass % of coumarins, and particles 3 - 16,8 mass %. Similarly, quantities of desorbed coumarins in aqueous solutions were estimated with the particles/water mass ratio of 1:10 (Fig. 2).

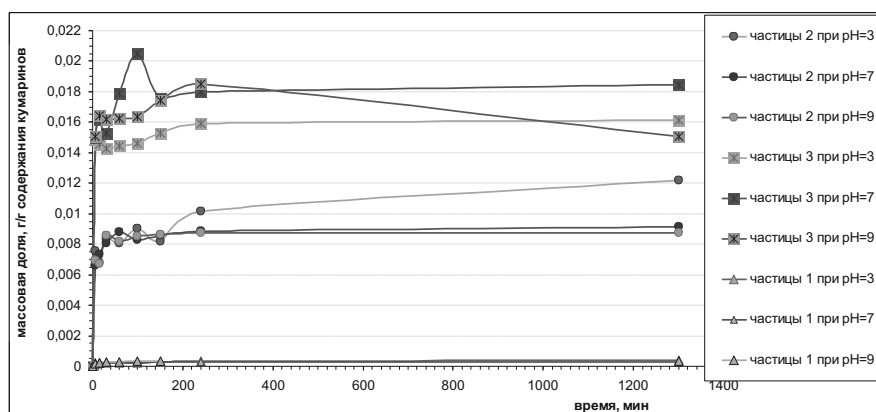


Figure 2. Comparative kinetics of furocoumarins desorption.

References:

1. Lozhkin, A.V., Sakanyan E.I. /Natural furanocoumarins: methods of allocation and the analysis// Chem. - Pharm. J. - 2006. - V.40. - No. 6, pp. 47-49. 2. Kuznetsova G.A. / Natural coumarins and furanocoumarins.// Leningrad: 1967. - 248 p. 3. Krutov P. V., Gromakova A.I., Saybel O.L. / Improvement of technology of receiving furanocoumarins from Ammi majus L. fruits /Pharmaceutical sciences 2014- VIII, pp. 54-56. 4. Marchenko I.V., Smirnova O.D., Bukreeva T.V., Kalashnikova I.V./ The lysozyme as a structural component of the microcapsules core-shell particles based on CaCO<sub>3</sub>.// Acta Naturae 2017, V.9 - S, pp. 173-174.

УДК 579.66

## ФОРМИРОВАНИЕ ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ БАКТЕРИАЛЬНЫМИ СООБЩЕСТВАМИ ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА

Лясникова В.Н., Калёнов С.В., Сорокин В.В., Складнев Д.А., Кузнецов А.Е.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1  
e-mail: lyasnikova-veronika1@ya.ru

Исследована способность бактериальных сообществ Онежского озера к формированию железосодержащих наночастиц. С помощью сообществ бактерий р. *Bacillus* и *Pseudomonas* получены наночастицы, охарактеризованные по размерам. Также исследовано разнообразие бактериальных сообществ Онежского озера.

**Ключевые слова:** металлические наночастицы; железосодержащие наночастицы; биоформирование наночастиц; наночастицы.

Биосинтез наночастиц (НЧ) металлов с помощью микроорганизмов является одним из существенных направлений исследований в нанобиотехнологии. Данный метод менее затратный, чем химические и физические методы, а также безопаснее с экологической точки зрения, так как не требует использования вредных реагентов. Полученные таким способом НЧ металлов могут находить применение в медицине, сельском хозяйстве, адресной доставке лекарств и создании биосенсоров [1,2].

Целью данной работы было тестирование бактерий Онежского озера на способность формирования железосодержащих НЧ. Онежское озеро обладает богатым запасом железных руд, и микроорганизмы, обитающие в зонах с высокой концентрацией ионов железа, способны в своих метаболических процессах формировать НЧ [3]. Для исследования были выбраны пробы воды как из участков озера с высоким содержанием общего железа в водной массе, так и участков с низким содержанием общего железа в водной массе.

Для получения НЧ были использованы растворы FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O и FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O концентрацией 0,5 г/л, которые добавлялись в двухдневные культуры, выращиваемые в колбах на модифицированной среде Гаузе на качалке при 22°C и 125 об/мин. Через 1-2 дня визуально оценивалось формирование НЧ в пробах по изменению окраски раствора в колбе на чёрную и выпадению осадка макрочастиц. С использованием этого метода были получены бактериальные НЧ для проб из Кондопожской губы, Большого Онега, Центрального Онега и Петрозаводской губы. Методом сканирующей электронной микроскопии были получены микрофотографии НЧ, а методом динамического рассеяния света были получены распределения НЧ по размеру. Для бактериальных сообществ, с помощью которых были получены НЧ, была произведена генетическая идентификация на основе 16S рРНК-анализа, показавшая, что в бактериальных сообществах преобладают представители р. *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Кроме получения железосодержащих НЧ также проводились исследования разнообразия бактериальной составляющей микробиоты Онежского озера. Из проб Онежского озера выделено 15 фенотипических групп аэробных гетеротрофных бактерий, для 14 из которых была проведена генетическая идентификация на основе 16S рРНК-анализа. Методом накопительных культур были выделены культуры актиномицетов из Кондопожской губы, азотфиксирующая культура из пробы Кондопожской губы; культуры нитрификаторов I и II фазы из проб Центрального Онега, Большого Онега и Петрозаводской губы. Полученные изоляты в дальнейшем будут охарактеризованы подробнее.

Литература:

1. Narayanan K.B., Sakthivel N. *Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes // Advances in colloid and interface science.* – 2010. – Vol. 156. – №. 1. – P. 1-13.
2. Hulkoti N.I., Taranath T.C. *Biosynthesis of nanoparticles using microbes – A review // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2014. – Vol. 121. – P. 474-483.
3. Онежское озеро. Атлас / Отв. ред. Н.Н. Филатов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. - 151 с.

УДК 579.66

## SYNTHESIS OF IRON-CONTAINING NANOPARTICLES USING BACTERIAL COMMUNITIES FROM LAKE ONEGO

**Lyasnikova V.N., Kalenov S.V., Sorokin V.V., Skladnev D.A., Kuznetsov A.E.**

*D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia  
 125480, Moscow, Geroyev Panfilovtsev st., 20k1  
 e-mail: lyasnikova-veronika1@ya.ru*

The capability of lake Onego bacterial communities to form iron-containing nanoparticles has been studied. Using the *Bacillus* and *Pseudomonas* bacterial communities, we obtained nanoparticles, whose sizes were characterized. The diversity of the lake Onego bacterial communities was also studied.

**Key words:** metal nanoparticles; iron-containing nanoparticles; biosynthesis of nanoparticles; nanoparticles.

Biosynthesis of metal nanoparticles (NPs) using microorganisms is one of the significant areas of research in nanobiotechnology. This method is less expensive than the chemical and physical methods, and it is also safer from an environmental perspective because it doesn't require any hazardous chemicals. Metal NPs produced by said method could be applied in medicine, agriculture, drug delivery, and creating biosensors [1,2].

The aim of this work was testing the lake Onego bacteria's capability to form iron-containing NPs. Lake Onego is endowed with iron ore reserves, and the microorganisms present in areas with high concentration of iron ions are able to form NPs in their metabolic processes [3]. For this research, the water samples from the lake regions with high concentration of total iron in the water mass were chosen, as well as the samples from the regions with low concentration of total iron in the water mass.

For the NPs synthesis, 0.5 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  solutions were used, which were added into 48h bacterial cultures, which were grown in flasks in the modified Gauze's medium on a shaker at 22°C and 125 rpm. In 1-2 days, the formation of NPs in samples was visually evaluated by the change of the solution's color in the flask to black and the sedimentation of macroparticles. Using this method, bacterial NPs were obtained for samples from Kondopozhskaya Bay, Big Onego, Central Onego and Petrozavodsk Bay. Microphotographies of NPs were obtained using scanning electron microscopy, and size distributions of NPs were obtained using dynamic light scattering. A genetic identification using the 16S rRNA analysis was performed for the bacterial communities that produced the NPS, which showed that the representatives of *Bacillus* and *Pseudomonas* prevail in the bacterial communities.

Besides obtaining the iron-containing NPs, the diversity of the bacterial part of the lake Onego microbiota was also studied. 15 phenotypic groups of aerobic heterotrophic bacteria from lake Onego water samples were isolated, 14 of which were genetically identified using the 16S rRNA analysis. Using the enrichment cultures method, the actinomycetes cultures from the Kondopozhskaya Bay samples, the nitrogen fixing bacteria from the Kondopozhskaya Bay samples; the nitrification bacteria of the 1st and 2nd stage from Central Onego, Big Onego and Petrozavodsk Bay samples have been isolated. The obtained isolates will be characterized in more detail later.

References:

1. Narayanan K.B., Sakthivel N. *Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes // Advances in colloid and interface science.* – 2010. – Vol. 156. – №. 1. – P. 1-13.
2. Hulkoti N.I., Taranath T.C. *Biosynthesis of nanoparticles using microbes – A review // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* – 2014. – Vol. 121. – P. 474-483.
3. Онежское озеро. Атлас / Отв. ред. Н.Н. Филатов. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2010. - 151 с.

УДК 577.1

## ЭНДОЛИЗИНЫ БАКТЕРИОФАГОВ: ЛИЗИС КЛЕТОК E.COLI ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАНИЗКОЧАСТОТНОГО ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

А.Д. Усвалиев<sup>1</sup>, А.В. Никитин<sup>2</sup>, П.Г. Рудаковская<sup>1</sup>, С.Л. Грибановский<sup>3</sup>, А.О. Жигачев<sup>3</sup>, Д.Ю. Головин<sup>3</sup>, С.А. Легоцкий<sup>1</sup>, М.М. Веселов<sup>1</sup>, К.Ю. Власова<sup>1</sup>, А.В. Лапанькова<sup>1</sup>, К.А. Мирошников<sup>4</sup>, Н.Г. Белогурова<sup>1</sup>, Е.А. Зайцева<sup>1</sup>, А.В. Кабанов<sup>1,5</sup>, А.Г. Мажуга<sup>2,1</sup>, Ю.И. Головин<sup>1,3</sup>, Н.Л. Клячко<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, 119991, Ленинские горы, 1-11Б, Россия

<sup>2</sup> Национальный технологический университет «МИСиС», Москва, Россия

<sup>3</sup> Наносервис, Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

<sup>4</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

<sup>5</sup> University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

<sup>6</sup> Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия

e-mail: azximik@gmail.com

Исследовано действие ультранизкочастотного переменного магнитного поля (УН ПМП) на лизис клеток E.coli, катализируемый эндолизином бактериофага S394 в присутствии модифицированных дофамином магнитных наночастиц. Полученные результаты показали возможность использования внешнего УН ПМП в усилении действия антибактериальных эндолизинов бактериофагов против грамотрицательных патогенов.

**Ключевые слова:** магнитные наночастицы, эндолизин, низкочастотное переменное магнитное поле

Эндолизины – гидролитические ферменты, кодируемые бактериофагами, которые расщепляют пептидогликан клеточной стенки бактерии. Эти ферменты обладают высокой степенью специфичности и могут заменить или использоваться в комбинации с антибиотиками для селективного лечения инфекционных заболеваний, вызванных бактериальными патогенами. Однако, действие эндолизинов против грамотрицательных бактерий ограничено, так как последние имеют внешнюю мембрану, которая является барьером для эндолизина и предотвращает его проникновение к пептидогликану [1].

Эффективность действия эндолизина, специфичного к грамотрицательным патогенам может быть увеличена за счет дестабилизации внешней мембраны последних. Согласно теоретической модели, действие ультранизкочастотного переменного магнитного поля (УН ПМП) на суспензию клеток с магнитными наночастицами (МНЧ) может привести к многократному увеличению проницаемости биологической мембраны клеток [2].

Целью работы стало изучение влияния МНЧ магнетита, модифицированных дофамином, на внешнюю мембрану клеток E.coli под действием ультранизкочастотного ПМП.

В исследовании применяли эндолизин бактериофага s394 и МНЧ в форме вытянутых “палочек” (40x10 нм), поверхность которых была функционализирована молекулами дофамина, которые могут взаимодействовать с фосфатными группами липидов внешней мембраны клеток (электростатические взаимодействия). Согласно теоретической модели, включение УН ПМП приводит МНЧ в сложное осциллирующее движение. При этом в мембране возникают осциллирующие силы и деформации с нормальной и латеральной компонентами. Такая деформация мембраны может увеличить эффективность проникновения фермента к своему субстрату, что приведет к увеличению скорости лизиса клеток.

По результатам проведенного исследования выявлено, что действие магнитного поля действительно приводит к увеличению скорости ферментативной реакции, что может быть связано именно с увеличением проницаемости внешней мембраны клеток E.coli. В доказательство наших предположений были проведены независимые эксперименты, первый, с участием периплазматического фермента β-лактамазы, и, второй, в присутствии гидрофобного красителя – Нильского красного. Показано, что дестабилизация внешней мембраны E.coli под действием УН ПМП приводит к выходу более 75% β-лактамазы из периплазмы клеток в межклеточное пространство. Отметим, что в отсутствие поля обнаруживается лишь 20% фермента в растворе. Известно, что Нильский красный способен флуоресцировать исключительно в неполярных средах [3]. Исследование дестабилизации внешней мембраны с помощью метки в присутствии МНЧ под действием УН ПМП показало, что при включении поля интенсивность флуоресценции красителя резко падает на порядок. После прекращения действия поля метка начинает вновь флуоресцировать и достигать прежнего значения уже в течение 5 – 10 минут.



Таким образом, проведенное исследование демонстрирует перспективы использования внешнего УН ПМП в усилении действия антибактериальных эндолизинов бактериофагов против грамотрицательных патогенов.

Финансовая поддержка: грант РФФ 14-13-00731П.

Литература:

1. Fischetti, V.A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives.// *Trends Microbiol.* 2005. Vol. 13. P. 491–496.
2. Golovin Y. et al. Single-domain magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field as mediators of local deformation of the surrounding macromolecules.// *Physics of the Solid State* 2014. Vol. 56. P. 1342-1351
3. 1985. Vol. 100, P. 965-973

UDC 577.1

## BACTERIOPHAGE ENDOLYSINS: LYSIS E.COLI UNDER ULTRALOW-FREQUENCY ALTERNATING MAGNETIC FIELD IN THE PRESENCE OF MAGNETIC NANORODS

A.D. Usvaliev <sup>1</sup>, A.V. Nikitin <sup>2</sup>, P.G. Rudakovskaya <sup>1</sup>, S.L. Gribanovsky <sup>3</sup>, A.O. Ghigachev <sup>3</sup>, D.Y. Golovin <sup>3</sup>, S.A. Legotsky <sup>1</sup>, M.M. Veselov <sup>1</sup>, K.Yu. Vlasova <sup>1</sup>, A.V. Lapankova <sup>1</sup>, K.A. Miroshnikov <sup>4</sup>, N.G. Belogurova <sup>1</sup>, E.A. Zaitseva <sup>1</sup>, A.V. Kabanov <sup>1,5</sup>, A.G. Majouga <sup>2,1</sup>, Yu. I. Golovin <sup>1,3</sup>, N.L. Klyachko <sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Leninskie Gory, 1-11B, Russia

<sup>2</sup> National University of Science and Technology "MISIS" (MISIS), Moscow, Russia

<sup>3</sup> G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia

<sup>4</sup> M.M. Shemyakin, Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

<sup>5</sup> University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA

<sup>6</sup> D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia  
 e-mail: azximik@gmail.com

The effect of ultralow-frequency alternating magnetic field (UL AMF) on the E.coli cells lysis catalyzed by bacteriophage S394 endolysin in the presence of dopamine-modified magnetic nanoparticles was investigated. The results obtained demonstrated the possibility of using external ultralow-frequency AMF in enhancing the action of antibacterial endolysins of bacteriophages against gram-negative pathogens.

**Key words:** magnetic nanoparticles, endolysin, ultralow-frequency alternating magnetic field.

Endolysins are hydrolytic enzymes encoded by bacteriophages, and they are responsible for cleaving the cell wall peptidoglycan of target bacteria. These lytic enzymes confer a high degree of specificity and could potentially replace or be utilized in combination with antibiotics, with the aim to specifically treat infections caused by bacterial pathogens. However, the activity of endolysins against gram-negative bacteria is limited because the outer membrane in the latter acts as a physical barrier and prevents endolysin from accessing the peptidoglycan from outside [1].

The effectiveness of endolysins active towards gram-negative bacteria can be increased by destabilizing the outer membrane in the latter. Theoretical studies of the interaction of functionalized magnetic nanorods (MNR) with a biological membrane have shown that the action of ultralow-frequency alternating magnetic field (AMF) can dramatically change membrane permeability [2].

The purpose of the work presented was to study the effect of ultra-low frequency AMF on the outer membrane of E.coli cells interacting with functionalized by dopamine magnetite MNRs (40x10 nm). Electrostatic interactions take place between positive charge of dopamine and negative charge of phosphate groups of lipids. Complex oscillating movements of MNRs occur under AMF application. In this case, oscillating forces and deformations with normal and lateral components appear in the membrane.

It was found out that bacteriophage S394 endolysin can significantly increase its catalytic activity in the E.coli cell wall lysis in the presence of MNRs under AMF exposure. Changes in membrane permeability under AMF action (membrane destabilizing effect) have been confirmed by two independent experiments. In the first one,  $\beta$ -lactamase release from E.coli cell periplasm was revealed upon magnetic field application. As shown, 75% of  $\beta$ -lactamase could be measured in supernatant of cell suspension after AMF application. In the second experiment, the hydrophobic dye Nile Red capable of fluorescing exclusively in nonpolar media was used [3]. As found, the fluorescence intensity of Nile Red sharply decreased ten times upon AMF application. It is worth mentioning that fluorescence was coming back after AMF was stopped reaching the initial intensity within 5-10 min (reversible

membrane permeability change).

Thus, the conducted study demonstrates the prospects of using external ultralow-frequency AMF in enhancing the action of antibacterial endolysins of bacteriophages against gram-negative pathogens.

The work was supported by RSF-14- 13-00731П grant.

*References:*

1. Fischetti, V.A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. // *Trends Microbiol.* 2005. Vol. 13. P. 491–496.
2. Golovin Y. et al. (2014). Single-domain magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field as mediators of local deformation of the surrounding macromolecules. // *Physics of the Solid State* 2014. Vol. 56. P. 1342-1351
3. Greenspan P. et al. Nile Red. A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. // *Journal of Cell Biology.* 1985. Vol. 100, P. 965-973

УДК: 576.5, ББК:

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРОВЕЗИКУЛ ММСК НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

**Р.С.Илларионов<sup>1</sup>, Н.В.Мещерякова<sup>1</sup>, А.Я.Лаврикова<sup>1</sup>, В.В.Морозов<sup>1</sup>, И.Е.Станишевская<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Российский университет дружбы народов (РУДН), Российская Федерация, 117198, Москва, Миклухо-Маклая, 6, stanishevskaya\_ie@pfur.ru, 8-499-936-86-25*

Исследования по влиянию микровезикул, полученных от мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК), на различные клеточные процессы имеют большое значение. В ходе исследований было рассмотрено влияние микровезикул, выделенных из кондиционной бессывороточной среды ММСК, на пролиферацию иммортализованных дермальных фибробластов при окислительном стрессе.

**Ключевые слова:** мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, клеточный стресс, микровезикулы.

Внеклеточные микровезикулы – мельчайшие мембранные пузырьки, секретируемые клетками в межклеточное пространство и выполняющие разнообразные функции. Сегодня собрано достаточно доказательств того, что терапевтический эффект ММСК обусловлен в значительной мере благодаря паракринным эффектам. В 2010 г. было показано, что паракринный эффект ММСК вызывается микровезикулами [1].

ММСК человека, выделенные из жировой ткани, культивировались при стандартных условиях, затем инкубировались в бессывороточной среде DMEM 12 часов. Кондиционная среда центрифугировалась 20 минут на 4 тыс. об., 20 мин. на 10 тыс. об. Надосадок инкубировали с конканавалином А (2 мг/л) при 4 °С одну ночь, на следующий день среду центрифугировали на 10 тыс. об. 40 мин. Осадок суспендировали в среде 1 мл DMEM, затем обрабатывали в ультразвуковой ванне.

Иммортализованные дермальные фибробласты линии 1608hT были посажены на 24-луночный планшет (11500 кл./лунка). На следующий день клетки были подвергнуты окислительному стрессу (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – при 30 мин.). Затем была произведена смена среды, и в разные ряды планшета были добавлены микровезикулы, L-цистеин в концентрации 4,7 мкл / лунка и 12.2 мкл / лунка, микровезикулы (12.5 мкл / лунка) и L-цистеин. На 3-е сутки после стресса клетки снимали раствором ЭДТА-трипсина, подсчитывали в камере Горяева.

Полученные результаты показали, что микровезикулы мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) стимулируют клеточную пролиферацию после окислительного стресса. Исследования влияния микровезикул ММСК на пролиферацию клеток при окислительном стрессе продолжаются.

*Литература:*

1. Lai R.C., Arslan F., Lee M.M., Sze N.S., Choo A., Chen T.S., Salto-Tellez M., Timmers L., Lee C.N., Oakley R.M., Pasterkamp G., de Kleijn D.P., Lim S.K. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury // *Stem Cell Res.* 2010. V. 4. P. 214–222.

**Финансирование:** Публикация подготовлена при поддержке программы РУДН «5-100».

UDC: 576.5, ББК:1

## DETERMINATION OF THE INFLUENCE OF MICROVESICLES OF MMSC ON THE PROLIFERATION OF DERMAL HUMAN FIBROBLASTS UNDER OXIDATIVE STRESS

R.Illarionov <sup>1</sup>, N.Meshcheryakova <sup>1</sup>, A.Lavrikova <sup>1</sup>, V.Morozov V.V. <sup>1</sup>, I.Stanishevskaya <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Peoples, Russian Federation, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya st., 6

Studies on the effect of microvesicles obtained from multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) on various cellular processes are great importance. In the course of the studies, the effect of microvesicles isolated from the conditioned serum-free medium of MMSC on the proliferation of immortalized dermal fibroblasts under oxidative stress was examined.

**Key words:** multipotent mesenchymal stem cells, cellular stress, microvesicles

Extracellular microvesicles are the smallest membrane bubbles secreted by cells into the intercellular space and performing various functions.

Today, there is sufficient evidence that the therapeutic effect of MMSC is due in large part to paracrine effects. In 2010, it was shown that the paracrine effect of MMSC is caused by microvesicles [1].

Human MMSCs isolated from adipose tissue were cultured under standard conditions, then incubated in a serum-free DMEM medium for 12 hours. The conditioned medium was centrifuged for 20 minutes at 4,000 vol., 20 minutes on 10 thousands vol. The supernatant was incubated with concanavalin A (2 mg / l) at 4 °C for one night, the next day, the medium was centrifuged at 10,000 vol. / 40 min. The precipitate was suspended in a 1 ml DMEM medium, then treated in an ultrasonic bath.

Immortalized dermal fibroblasts line 1608hT were planted on a 24-well plate (11,500 cells / well). The next day, the cells were subjected to oxidative stress (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - at 30 min.). Then, a medium was changed, and microvesicles, L-cysteine in concentration 4.7 μL / well and 12.2 μL / well, microvesicles (12.5 μL / well) and L-cysteine were added to different rows of the plate. On the 3rd day after the stress, the cells were removed with a solution of EDTA-trypsin, counted in the Goryaev chamber.

The results obtained showed that the multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) microvesicles stimulate cellular proliferation after oxidative stress. Investigations of the influence of microvesicles of MMSC on the proliferation of cells under oxidative stress continue.

References:

1. Lai R.C., Arslan F., Lee M.M., Sze N.S., Choo A., Chen T.S., Salto-Tellez M., Timmers L., Lee C.N., Oakley R.M., Pasterkamp G., de Kleijn D.P., Lim S.K. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury // *Stem Cell Res.* 2010. V. 4. P. 214–222.

**Grant:** The publication has been prepared with the support of the «RUDN University Program 5-100»

## МЕТАГЕНОМИКА И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА

## METAGENOMICS AND PERSONALIZED MEDICINE

1. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛКАМИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ - НОВЫЙ ПОДХОД В ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ, Фетисов С.О. ....	330
HORMONAL REGULATION BY BACTERIAL PROTEINS FROM GUT MICROBIOTA - NEW APPROACH IN PERSONALIZED MEDICINE, Fetisov S.O. ....	331
2. АКТИВНОСТЬ ИЗОФОРМ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, Д.И.Козлова, А.В.Попов, М.Ф.Баллузек, П.А.Игнатъева .....	332
CHOLINESTERASE ISOFORMS ACTIVITY IN AUTOIMMUNE DISEASES, D.Kozlova, A.Popov, M.Balluzek, P.Ignatyeva.....	333
3. АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ, Полуэктова Е.У., Марсова М.В., Абилов С.К., Лапченко А.Э., Ковтун А.С., Даниленко В.Н. ....	335
ANTIOXIDANT POTENTIAL OF HUMAN MICROBIOTA IN NORM AND PATHOLOGY, Poluektova E.U., Marsova M.V., Abilev S.K., Laptenko A.E., Kovtun A.S., Danilenko V.N. ....	336
4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНОЙ ЛИПИДОМИКИ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РИСКА РАЗВИТИЯ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА, А.В.Тимофеева .....	337
THE USE OF MICROBIAL LIPIDOMICS FOR CONSTRUCTION OF THE MODEL OF INDIVIDUAL RISK OF DEVELOPMENT OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS, A.Timofeeva .....	338
5. ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТУР ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РЕГИОНАЛЬНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, Цветкова А.В., Динова Р.К., Хлопова К.В. ....	339
THE STUDY OF CULTURES OF LACTO- AND BIFIDOBACTERIA TO CREATE A REGIONAL PROBIOTIC PREPARATIONS, Tsvetkova A.V., Dinova R.K., Hlopova K.V. ....	340
6. МЕТАБОЛОМНЫЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ, Ситкин С.И., Вахитов Т.Я., Демьянова Е.В., Шалаева О.Н., Утсаль В.А. ....	341
A METABOLOMICS APPROACH TO IDENTIFY POTENTIAL BIOMARKERS OF CHRONIC INFLAMMATION, Sitkin S.I., Vakhitov T.Ya., Demyanova E.V., Shalaeva O.N., Utsal V.A. ....	342
7. МИКРОБИОМ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ДЕТЕЙ И АУТИЗМ, Ребриков Д.В., Аверина О.В., Ковтун А.С., Даниленко В.Н. ....	343
GUT MICROBIOME OF CHILDREN AND AUTISM, Rebrikov D. V., Averina O. V., Kovtun A. S., Danilenko V. N. ....	344
8. ОБНАРУЖЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ LNA ЗОНДОВ, Соловьева М.Н., Гудов В.П., Ткачук А.П., Гушчин В.А. ....	345
DETECTION OF BACTERIAL PATHOGENS USING FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION WITH LNA PROBES, Solovyova M.N., Gudov V.P., Tkachuk A.P., Gushchin V.A. ....	346
9. РАЗРАБОТКА ПСИХОБИОТИКОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ДЕПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ, Юнес Р.А., Полуэктова Е.У., Козловский Ю.Е., Ковалёв Г.И., Даниленко В.Н. ....	348
DEVELOPMENT OF PSYCHOBOTICS FOR PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF DEPRESSIVE DISORDERS OF VARIOUS ETIOLOGIES, Yunes R.A., Poluektova E.U., Kozlovsky Y.E., Kovalev G.I., Danilenko V.N. ....	349
10. СИСТЕМЫ ТОКСИН-АНТИТОКСИН II ТИПА КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОСТАВА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА, К.М.Климина, Е.У.Полуэктова, М.В.Одорская, В.Н.Даниленко .....	350
TYPE II TOXIN-ANTITOXIN SYSTEMS AS FUNCTIONAL MARKERS FOR METAGENOMIC STUDIES, K.Klimina, E.Poluektova, M.Odorskaya, V.Danilenko .....	351
11. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ЖКТ ЧЕЛОВЕКА: ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ НЕИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, Даниленко В.Н. ....	352
FUNCTIONAL METAGENOMIC ANALYSIS OF THE HUMAN GUT MICROBIOTA: POTENTIAL FOR PERSONALIZED TREATMENT OF NON-INFECTIOUS DISEASES, Danilenko V.N. ....	353

## ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛКАМИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ - НОВЫЙ ПОДХОД В ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ.

**Фетисов С.О.**

Лаборатория нейроэндокринной и нейронной дифференциации и коммуникации, Инсерм 1239 Руанский университет, 25 ул. Люсьен Теньер, 76130 Мон-Сент-Энан, Франция.  
 e-mail: Serguei.Fetissov@univ-rouen.fr

Пептидные гормоны участвуют в нейроэндокринной регуляции. Исследования показали, что специфические белки, продуцируемые комменсальными бактериями могут имитировать пептидные гормоны хозяина. Идентификация таких бактериальных белков миметиков представляет собой новую стратегию развития персонализированной медицины включая нейropsychиатрические заболевания.

**Ключевые слова:** кишечная микробиота, пептидные гормоны, молекулярная мимикрия, нейropsychиатрические заболевания, пробиотики.

Некоторые пептидные гормоны критически участвуют в регуляции специфических гомеостатических функций и мотивированного поведения у людей и животных. Например, альфа-меланоцит-стимулирующий гормон ( $\alpha$ -МСГ) представляет собой 1,6 кДа пептид, продуцируемый в мозге и гипофизе критически вовлечен в регуляцию энергетического гомеостаза. Дефицит в сигнализации  $\alpha$ -МСГ приводит к гиперфагии и ожирению. Обнаружение  $\alpha$ -МСГ-реактивных аутоантител в плазме здоровых людей предполагает, что такие аутоантитела могут быть получены в ответ на антигены из бактерий кишечника (1). Использование подходов *in silico* определило бактерии *E.coli* в качестве кандидатов продуцирующих белки с молекулярной мимикрией с  $\alpha$ -МСГ (2). Дальнейшие исследования с использованием протеомики идентифицировали в *E.coli* 96 кДа белок гомологичный казеинолитической протеазы Б (Клип-Б) в качестве конформационного миметика  $\alpha$ -МСГ (3). Показано, что Клип-Б отвечает за продуцирование  $\alpha$ -МСГ-реактивных антител. Более того, бактериальный Клип-Б был обнаружен в крови, пропорционально наличию ДНК Клип-Б в фекальной микробиоте, что предполагает его роль в качестве гормонального фактора. Действительно, нанесение Клип-Б на мозг мышей активировал гипоталамические анорексигенные нейроны (4). Важно отметить, что  $\alpha$ -МСГ-миметические свойства ClpB зависят от  $\alpha$ -МСГ-подобного эпитопа, специфичного для Enterobacteriaceae (5). В настоящее время пищевой штамм Enterobacteriaceae проходит испытания в компании Таргедис (Франция) в качестве пробиотика продуцирующего Клип-Б, для снижения веса тела у человека. В совокупности, эти исследования доказывают роль конкретного бактериального белка в гормональной регуляции энергетического гомеостаза и создают основу для новой стратегии развития пробиотической терапии избыточного веса тела (6). Такая стратегия может быть применена к идентификации бактериальных миметических белков других пептидных гормонов, участвующих в патогенезе различных хронических состояний включая нейropsychиатрические заболевания.

### Литература:

1. Fetissov SO, et al. (2002) Autoantibodies against  $\alpha$ -MSH, ACTH, and LHRH in anorexia and bulimia nervosa patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(26):17155-17160.
2. Fetissov SO, et al. (2008) Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: putative modulation by gut microflora. *Nutrition* 24(4):348-359.
3. Tennoune N, et al. (2014) Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide [ $\alpha$ ]-MSH, at the origin of eating disorders. *Transl Psychiatry* 4:e458.
4. Breton J, et al. (2016) Gut commensal *E.coli* proteins activate host satiety pathways following nutrient-induced bacterial growth. *Cell Metab* 23:1-11.
5. Fetissov SO, Legrand R, & Lucas N (2017) Bacterial protein mimetic of peptide hormone as a new class of protein-based drugs. *Curr Med Chem*.
6. Fetissov SO (2017) Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat Rev Endocrinol* 13:11-25.

## HORMONAL REGULATION BY BACTERIAL PROTEINS FROM GUT MICROBIOTA - NEW APPROACH IN PERSONALIZED MEDICINE

**Fetissov S.O.**

*Inserm UMR 1239 "Neuroendocrine and neuronal differentiation and communication" Laboratory, University of Rouen, 25 Rue Lucien Tesnière, 76130 Mont-Saint-Aignan, France.  
e-mail: Serguei.Fetissov@univ-rouen.fr*

Peptide hormones are involved in the neuroendocrine regulation of homeostatic functions. Recent studies showed that specific proteins produced by commensal gut bacteria can mimic peptide hormones and influence peptidergic signaling of the host. Identification of such bacterial mimetic proteins represents a new strategy for the development of personalized medicine including neuropsychiatric diseases.

**Key words:** gut microbiota, peptide hormones, molecular mimicry, neuropsychiatric disorders, probiotics.

Several peptide hormones are critically involved in regulation of specific homeostatic functions and motivated behavior in humans and animals. For instance,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), a 1.6 kDa peptide produced in the brain and pituitary is critically involved in the regulation of energy homeostasis. A deficit in  $\alpha$ -MSH signaling results in hyperphagia and obesity. Detection of  $\alpha$ -MSH-reactive autoantibodies in plasma of healthy humans suggested that such autoantibodies can be produced in response to antigens from commensal gut bacteria (1). Using *in silico* approaches *E.coli* bacteria were shown as candidates producing the proteins with molecular mimicry to  $\alpha$ -MSH (2). Further studies using proteomic approaches in *E.coli* identified 96 kDa protein homologue of caseinolytic protease B (ClpB) as a conformational mimetic of  $\alpha$ -MSH (3). ClpB was shown to be responsible for production of  $\alpha$ -MSH-cross reactive antibodies. Moreover, bacterial ClpB was detected in blood circulation in direct proportion to ClpB DNA in gut bacteria supporting its role as a bacteria-derived  $\alpha$ -MSH like hormonal factor. Indeed, ClpB application on mouse brain section was able to activate hypothalamic anorexigenic neurons (4). Importantly,  $\alpha$ -MSH-mimetic properties of ClpB depend on  $\alpha$ -MSH-like epitope specific to Enterobacteriaceae (5). Currently, a food-grade strain of Enterobacteriaceae is validated by TargEDys company (France) as a ClpB-producing probiotic aimed at weight loss in humans. Taken together, these studies reveal a role of a specific bacterial protein in hormonal signaling involved in regulation of energy balance and provide an example of a new strategy for the development of probiotic-based therapy of overweight (6). Such strategy can be applied for the identification of bacterial mimetic proteins of others peptide hormones leading to the personalized approach to several chronic pathological conditions including neuropsychiatric disorders.

### References:

1. Fetissov SO, et al. (2002) Autoantibodies against  $\alpha$ -MSH, ACTH, and LHRH in anorexia and bulimia nervosa patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(26):17155-17160.
2. Fetissov SO, et al. (2008) Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: putative modulation by gut microflora. *Nutrition* 24(4):348-359.
3. Tennoune N, et al. (2014) Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide [ $\alpha$ ]-MSH, at the origin of eating disorders. *Transl Psychiatry* 4:e458.
4. Breton J, et al. (2016) Gut commensal *E.coli* proteins activate host satiety pathways following nutrient-induced bacterial growth. *Cell Metab* 23:1-11.
5. Fetissov SO, Legrand R, & Lucas N (2017) Bacterial protein mimetic of peptide hormone as a new class of protein-based drugs. *Curr Med Chem*.
6. Fetissov SO (2017) Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat Rev Endocrinol* 13:11-25.

УДК: 577.29, ББК: 28.070

## АКТИВНОСТЬ ИЗОФОРМ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

 Д.И.Козлова<sup>1</sup>, А.В.Попов<sup>1</sup>, М.Ф.Баллюзек<sup>2</sup>, П.А.Игнатъева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО "Научно-производственная фирма "АБРИС+", Россия, 196084, Санкт-Петербург, Цветочная, 16, лит. М, KozlovaDI@abrisplus.ru, 89118205979

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения Санкт-Петербургская клиническая больница Российской академии наук, Россия, 194017, Санкт-Петербург, проспект Тореза, 72 лит.А, marina.ballyzek@mail.ru, 8 (812) 323-45-35

При аутоиммунных патологиях возрастает активность бутирилхолинэстеразы за счет изменения вклада различных ее изоформ. При ревматоидном артрите показано возрастание активности типичной и минорных форм, тогда как при аутоиммунном тиреоидите возрастает активность типичной и атипичной форм, а при латентном аутоиммунном сахарном диабете взрослых активность всех исследованных форм бутирилхолинэстеразы.

**Ключевые слова:** Бутирилхолинэстераза, ревматоидный артрит, остеоартрит, плазма крови.

Аутоиммунные заболевания (АИЗ) - это системные заболевания, возникающие при нарушении функционирования иммунной системы, которая начинает воспринимать собственные ткани, как чужеродные, и атаковать их, что приводит к разрушению организма в целом. Аутоиммунным заболеваниям подвержены более 606 миллионов человек. Известно, что на самых ранних стадиях данный тип заболеваний часто остается незамеченным, поскольку, существующие маркеры не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью. К тому же аутоиммунные заболевания склонны к симптоматической мимикрии с заболеваниями, имеющими другую природу, что может приводить к постановке ошибочного диагноза, выбору неверной стратегии лечения и потере времени, в течение которого еще можно вернуть показатели к возрастной норме или добиться устойчивой ремиссии. К таким заболеваниям относится ревматоидный артрит (РА), аутоиммунный тиреоидит (АИТ), латентный аутоиммунный диабет взрослых (latent autoimmune diabetes in adults, LADA). Для диагностики данных заболеваний используют ряд критериев, среди которых наибольшую диагностическую ценность имеют для РА - антитела к циклическим цитруллинированным пептидам (анти-ЦЦП) [1], для АИТ - антитела к тиреоидной пероксидазе (анти-ТПО) и для LADA - антитела к тиреоглобулину (анти-ТГ), глутаматдекарбоксилазе (GAD), тирозинфосфатазе белков (IA-2), инсулину и транспортеру цинка ZnT8. Однако, известно, что почти у 40% пациентов даже на поздних стадиях заболеваний они не выявляются. Наличие таких пациентов подчеркивает необходимость поиска новых биомаркеров, которые бы позволяли точно и на ранних стадиях определить то или иное АИЗ, а также отделить его от других заболеваний. Ранее, нами было продемонстрировано, что возможным маркером аутоиммунного воспаления может являться активность бутирилхолинэстеразы (БХЭ) плазмы крови, которая повышается при аутоиммунных патологиях, а при заболеваниях иной природы остается на контрольном уровне [2]. Из литературных данных известно, что кроме типичной формы БХЭ (т-БХЭ), устойчивой к ингибированию тизанидином, существует также атипичная форма (а-БХЭ), устойчивая к хлориду суксаметония, и минорные изоформы (ми-БХЭ), сохраняющие активность в присутствии обоих указанных ингибиторов [3]. Цель данной работы выявить, какие изоформы БХЭ вносят вклад в повышение ее общей активности при РА, АИТ и LADA.

В данном исследовании принимали участие пациенты следующих групп: контрольная группа без аутоиммунных нарушений (КГ, n = 20); пациенты с РА, длительностью более двух лет (n = 9); пациенты с АИТ (n = 5). Все пациенты или их представители дали информированное согласие на участие в исследовании. Плазму крови выделяли из центральной крови, забранной в вакуумные пробирки с напылением литий-гепарина, путем центрифугирования при 20000g в течение 15 минут при 20°C. Пробы были нормированы по белку с использованием метода М.М. Брэдфорд [4]. Активность форм БХЭ определяли модифицированным методом Элмана [5], в сочетании с ингибиторным анализом. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы Microsoft Office Excel 2010 с надстройками для проведения дисперсионного анализа ANOVA. Результаты представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего. Достоверность отличий оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента и различия считались значимыми при p ≤ 0,05.

Результаты нашего исследования продемонстрировали, что у пациентов группы РА возрастает активность т-БХЭ (0,0693 ± 0,0001 нмоль субстрата/мг/мин) и ми-БХЭ (0,0395 ± 0,0001) форм БХЭ, и это почти в

2 раза выше, чем активность т-БХЭ у пациентов КГ. Активность минорных форм у пациентов КГ не регистрируется. При АИТ наблюдался рост активности типичной ( $0,0702 \pm 0,0003$ ) и атипичной ( $0,0407 \pm 0,0001$ ) форм исследуемого фермента, тогда как у групп КГ и РА активность атипичной формы не регистрировалась, что полностью согласуется с данными литературы (ссылка, что у очень небольшого % людей есть ее активность). Соотношение активностей т-БХЭ и а-БХЭ приблизительно 2 к 1. У пациентов с диагнозом LADA наблюдалось повышение, как типичной ( $0,0579 \pm 0,0001$ ) и атипичной ( $0,0201 \pm 0,0001$ ), так и минорных ( $0,0170 \pm 0,0002$ ) форм БХЭ. Соотношение активностей этих изоформ составляет приблизительно 2 к 1 к 0,5, соответственно. Это свидетельствует о том, при развитии разных аутоиммунных патологий в увеличение ее общей активности вносят вклад разные формы БХЭ, что позволяет достаточно четко разделить их между собой, а отклонение общей активности БХЭ от уровня КГ может свидетельствовать о повышенном риске развития АИЗ.

На основании полученных данных, можно сделать вывод о том, что наибольшую диагностическую ценность для определения РА имеет определение активности т-БХЭ и ми-БХЭ, для АИТ – т-БХЭ и а-БХЭ, а для LADA всех исследованных изоформ. Результаты проведенного исследования предполагается использовать для создания диагностического теста дифференцированной диагностики АИЗ.

#### Литература:

1. Руководство по аутоиммунным заболеваниям для врачей общей практики / Под ред. И. Шенфельд и соавт. - СПб.: Медкнига "ЭЛБИ". - 2017. - 416 с. 2. Козлова Д.И., Попов А.В. Бутирилхолинэстераза как потенциальный биомаркер аутоиммунных заболеваний //Международная научная конференция по биоорганической химии "XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова и VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды": тезисы докл. (Москва, 18-22 сентября 2017). - М., 2017 - С. 74. 3. Локридж. О. Обзор структуры, функции, генетических вариантов, истории использования в клинике и потенциального терапевтического использования бутирилхолинэстеразы // Фармакология и терапия. – 2015. – №148. – С. 34-46. 4. Бредфорд М.М. Быстрый и чувствительный метод количественного определения количества микрограмм белка, использующего принцип связывания белок-краситель // Аналитическая Биохимия. - 1976. - № 72. - С. 248-254. 5. Эллман Г.Л., Кортни К.Д., Эндрюс В.Дж., Фисерстон Р.М. Новое и быстрое колориметрическое определение активности ацетилхолинэстеразы // Биохим. Фармакол. - 1961. - №7. - С. 88-95.

**Финансирование:** Финансирование работы проводилось из средств ООО "Научно-производственной фирмы "АБРИС+".

UDC 577.29, BBC 28.070

## CHOLINESTERASE ISOFORMS ACTIVITY IN AUTOIMMUNE DISEASES

D.Kozlova <sup>1</sup>, A.Popov <sup>1</sup>, M.Balluzek <sup>2</sup>, P.Ignatyeva <sup>2</sup>

<sup>1</sup> LLC «Scientific and Production Company «ABRIS+», Russia, 196084, Saint-Petersburg, Tsvetochnaya, 16, lit. M

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Healthcare Institution St. Petersburg Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences, Russia, 194017, Saint-Petersburg, prospect Toreza, 72 lit.A

In autoimmune pathologies, the butyrylcholinesterase activity increases due to a change of its various isoforms contribution. In rheumatoid arthritis, it was shown a growth of typical and minor forms activity, whereas in autoimmune thyroiditis, there was increase of typical and atypical forms activity, and in latent autoimmune diabetes of adults, the was shown a growth of all the studied butyrylcholinesterase forms activity.

**Key words:** Butyrylcholinesterase, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, blood plasma.

Autoimmune diseases (AID) are systemic diseases that occur when there functional disturbed immune system begins to perceive its own tissues as foreign, and attack them, this leads to the destruction of the organism as a whole. More than 606 million people are susceptible to autoimmune diseases. It is known that at the earliest stages this type of diseases often goes unnoticed, because existing markers do not have sufficient sensitivity and specificity. In addition, autoimmune diseases are prone to symptomatic mimicry with diseases of a different nature, which can lead to an erroneous diagnosis, the choice of an incorrect treatment strategy, and the loss of time during which it is still possible to return the indicators to the age-appropriate rate or achieve a stable remission. Such diseases include rheumatoid arthritis (RA), autoimmune thyroiditis (AIT), latent autoimmune diabetes in adults (LADA). To diagnose these diseases, a number of criteria is used, among which the highest diagnostic value for RA is antibodies to cyclic citrullinated peptides (anti-CCP) [1], for AIT - antibodies to thyroid peroxidase (anti-TPO) and for LADA - antibodies to thyroglobulin (anti-TG), glutamate decarboxylase (GAD), tyrosine phosphatase proteins (IA-



2), insulin and zinc transporter ZnT8. However, it is known that even in the late stages of the disease almost in 40% of patients they are not detected. The presence of such patients emphasizes the need to search new biomarkers that would allow the identification of a particular AID accurately and at an early stage, and also differentiate it from other diseases. Previously, we have demonstrated that the possible marker of autoimmune inflammation may be the of blood plasma butyrylcholinesterase (BChE) activity, which increases in autoimmune pathologies, and remains at the control level in diseases of another nature [2]. From literature, it is known that in addition to the typical BChE form (t-BChE), resistant to tizanidine inhibition, there is also suxamethonium chloride resistant atypical form (a-BChE), and minor isoforms (mi-BChE) that retain activity in the presence of both these inhibitors [3]. The purpose of this work is to identify which isoforms of BChE contribute to the increase of its overall activity in RA, AIT and LADA.

In this study participated the following groups of patients: control group without autoimmune disorders (CG, n = 20); patients with RA, lasting more than two years (n = 9); patients with AIT (n = 5). All patients or their representatives gave informed consent for participation in the study. Blood plasma was isolated from the central whole blood collected in vacuum tubes with lithium-heparin spraying, by centrifugation at 20,000 g for 15 minutes at 20 ° C. The samples were normalized to the protein using the method of M.M. Bradford [4]. The activity of the BChE forms was determined by the modified Ellman's method [5], in combination with inhibitory analysis. Statistical analysis of the data was carried out using Microsoft Office Excel 2010 with add-ons for ANOVA analysis. The results are presented as the mean  $\pm$  mean error. The reliability of the differences was assessed using Student's t-test and the differences were considered significant at  $p \leq 0,05$ .

The results of our study demonstrated that in patients of RA group, the activity of t-BChE ( $0.0693 \pm 0.0001$  nmol substrate / mg / min) and mi-BChE ( $0.0395 \pm 0.0001$ ) BuChE forms increases, and it is almost 2 times higher than the activity of t-BHE in CG patients. The activity of minor forms in CG patients not registered. In AIT, there was an increase in activity of typical ( $0.0702 \pm 0.0003$ ) and atypical ( $0.0407 \pm 0.0001$ ) forms of the investigated enzyme, whereas in groups of CG and RA activity of the atypical form was not recorded, which completely agrees with literature data (). The ratio of the activities of t-BChE and a-BChE was approximately 2 to 1. In LADA patients there was an increase in typical ( $0.0579 \pm 0.0001$ , atypical ( $0.0201 \pm 0.0001$ ) and minor ( $0, 0170 \pm 0.0002$ ) forms of BChE. The ratio of the activities of these isoforms is approximately 2 to 1 to 0.5, respectively. This indicates that in the development of different autoimmune pathologies, the different BChE forms contribute to the increase in its overall activity, which allows to clearly divided them from each other, and a deviation of general BChE activity from the CG level may indicate an increased risk of AID development.

Based on the obtained data, it can be concluded that the greatest RA diagnostic value has a determination of the t-BChE and mi-BChE activity, for AIT- t-BChE and a-BChE, and for the LADA of all the studied isoforms. The results of the study will be used to create a diagnostic test for differentiated diagnosis of AIDs.

#### References:

1. *Manual on autoimmune diseases for general practitioners / Ed. I. Shenfeld et al. - SPb.: Medkniga "ELBI". - 2017. - 416 p.*
2. Kozlova DI, Popov A.V. Butyrylcholinesterase as a potential biomarker of autoimmune diseases // *International Scientific Conference on Bioorganic Chemistry "XII reading of the memory of Academician Yu.A. Ovchinnikov and VIII Russian Symposium" Proteins and Peptides": Abstracts of the report (Moscow, September 18-22, 2017).*, 2017 - p. 74.
3. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses // *Pharmacology and Therapeutics.* – 2015. – №148. – R. 34-46
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry.* – 1976. – №72. – R. 248-254.
5. Ellman G.L., Courtney K.D., Andreas V.J., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem Pharmacol.* – 1961. – №7. – R. 88-95.

**Grant:** The the work was financed from funds of LLC "Scientific and Production Company" ABRIS + " .

УДК 579.22; 615.33

## АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

Полуэктова Е.У., Марсова М.В., Абилов С.К., Лаптенко А.Э., Ковтун А.С., Даниленко В.Н.

Федеральное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия  
119991 Москва, ул.Губкина, д.3  
e-mail: epolu@vigg.ru

Коллекция из 81 штамма лактобацилл проанализирована по антиоксидантным свойствам с помощью биолюминесцентной тест-системы. Отобраны пять активных штаммов, их ДНК секвенирована и идентифицированы гены белков-антиоксидантов. Составлен каталог таких генов для лактобацилл и их ортологов для родов бактерий кишечной микробиоты и использован для анализа метагеномов кишечника.

**Ключевые слова:** микробиота; лактобациллы; антиоксиданты; метагеномы

Микробиота человека – сообщество комменсальных, симбиотических и патогенных микроорганизмов, населяющих его тело. Бактерии микробиоты оказывают существенное влияние на метаболические процессы и функционирование иммунной и нервной систем макроорганизма. Для практических целей важной группой бактерий микробиоты являются симбиотические бактерии рода *Lactobacillus*, оказывающие положительное влияние на здоровье людей; они могут выращиваться в лабораторных условиях и используются в медицинской и пищевой промышленности.

Окислительный стресс является причиной или важной составляющей многих заболеваний (онкологических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и др.) Перечисленные заболевания, как и окислительный стресс сам по себе, приводят к изменению состава кишечной микробиоты. Антиоксидантная (АО) активность обнаружена у отдельных штаммов лактобацилл более чем 10 видов как в опытах *in vitro*, так и в отдельных работах на людях.

Для отбора штаммов лактобацилл с АО свойствами мы исследовали коллекцию из 81 штамма лактобацилл пяти видов в биолюминесцентной тест-системе с плазмидами-биосенсорами, реагирующими на присутствие супероксид-аниона (параквата) и перекись водорода. Более 60% из исследованных штаммов демонстрировали АО активность [1]. Активность ряда штаммов была подтверждена ТЕАС тестом и опытами на нематоде *C.elegans*. У пяти штаммов, зарекомендовавших себя как наиболее активные антиоксиданты, были секвенированы геномы и в них были идентифицированы гены, кодирующие основные АО ферменты (каталазу, пероксидазу тиоредоксин и тиоредоксин редуктазу, глутатион редуктазу и др.). Один из штаммов сейчас проходит доклинические исследования как препарат сопровождения химио- и лучевой терапии онкологических заболеваний, направленный против мукозита [2]. Отобранные штаммы лактобацилл с максимальной АО активностью и знания о содержащихся в них генах могут быть использованы для формирования пробиотических препаратов, содержащих их различные композиции.

Создан каталог генов лактобацилл, кодирующих основные белки-антиоксиданты. Проанализировано распространение этих генов в 134 полностью секвенированных геномах лактобацилл 38 видов из GenBank; установлено, что это распространение является преимущественно видоспецифичным. Можно рекомендовать включение в состав пробиотиков с АО свойствами штаммы *L.casei* и *L.paracasei*, содержащие редкие у лактобацилл гены супероксиддисмутазы и, вероятно, продуцирующих данный фермент.

Создан каталог генов, кодирующих белки-антиоксиданты, для родов бактерий, являющихся основными компонентами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека. В метагеномах ЖКТ человека (из базы данных проекта Human Microbiome Project и образцов, секвенированных нами) идентифицированы совокупности ортологов генов, кодирующих белки-антиоксиданты различных родов. Эти данные могут быть использованы для характеристики АО потенциала микробиоты групп людей и конкретных индивидуумов, для разработки диагностических тест-систем, для целенаправленного создания и использования композиции различных пробиотических бактерий, несущих нужные антиоксидантные гены для восстановления нормального функционирования микробиоты и, как следствие, здоровья человека.

Литература:

1. Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of *Lactobacillus* strains from human microbiota//World J Microbiol Biotechnol. 2018. Vol.34. №2. 27.
2. Патент РФ № 2617946, 28.04.2017.

579.22; 615.33

## ANTIOXIDANT POTENTIAL OF HUMAN MICROBIOTA IN NORM AND PATHOLOGY

Poluektova E.U., Marsova M.V., Abilev S.K., Laptenko A.E., Kovtun A.S., Danilenko V.N.

Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
 119991 Moscow, Gubkin St.3  
 e-mail: epolu@vigg.ru

A collection of 81 *Lactobacillus* strains was screened for antioxidant properties using a bioluminescent test system. Five active strains were selected, their DNA sequenced, and the genes coding for antioxidant proteins identified. A gene catalogue consisting of genes from lactobacilli and other bacterial genera from the gut microbiota was built for the analysis of gut metagenomes.

**Key words:** microbiota; lactobacilli; antioxidants; metagenomes

The human microbiota is a community of commensal, symbiotic and pathogenic microorganisms inhabiting the human body. The bacterial microbiota exerts a significant effect on host metabolism and the functioning of both immune and nervous systems. Lactobacilli are an important group of symbiotic bacteria, often isolated from the human microbiota, that have a positive effect on human health; they can be cultivated in the laboratory and are used in the medical and food industries.

Oxidative stress can be the cause or at least an important aspect of many diseases (oncological, cardiovascular, neurodegenerative, etc.). These diseases and oxidative stress can lead to a change in the composition of the gut microbiota. The antioxidant (AO) activity was shown for single *Lactobacillus* strains belonging to more than 10 species in *in vitro* experiments, and in few clinical studies.

The selection of *Lactobacillus* strains with AO properties was carried out among a collection of 81 *Lactobacillus* strains of five species using a bioluminescent test system containing plasmid biosensors reacting to the presence of superoxide anion (paraquat) and hydrogen peroxide. More than 60% of the strains showed AO activity [1]. The activity of some strains was confirmed in the TEAC test and the *in vivo* *C.elegans* model. The genomes of five strains showing the highest AO activity were sequenced and the genes encoding the basic AO enzymes (catalase, thioredoxin peroxidase, thioredoxin reductase, glutathione reductase, etc.) were identified. One of the strains is now undergoing preclinical studies for the use as an adjuvant drug for chemotherapy-induced mucositis [2]. The identification of genes accounting for high AO activity in the selected strains can be useful for developing drugs containing probiotics with various compositions of those genes.

A gene catalog consisting of genes of lactobacilli encoding the main antioxidant proteins was created. The distribution of these genes in 134 fully sequenced lactobacilli genomes of 38 species from GenBank was analyzed; it was established that this distribution is mainly species-specific. Based on our results, we recommend that the species *L.casei* and *L.paracasei* are used as antioxidants since they contain genes encoding a superoxide dismutase.

A gene catalog consisting of genes encoding antioxidant enzymes from the main bacterial genera of the gut microbiota was created. These genes were identified in sequenced gut metagenome samples from the Human Microbiome Project and from Russian people (sequenced in our laboratory). The obtained data can be used to characterize the AO potential of the microbiota of groups of people and distinct individuals, for the development of diagnostic test systems, for the purposeful creation and use of a composition of various probiotic bacteria carrying the necessary antioxidant genes to restore the normal functioning of the microbiota and, as a result, human health.

### References:

1. Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota//*World J Microbiol Biotechnol.* 2018. Vol.34. №.2. 27.
2. Russian patent N 2617946, 28.04.2017.

УДК: 579.61

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНОЙ ЛИПИДОМИКИ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РИСКА РАЗВИТИЯ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА

А.В. Тимофеева

ФГБОУ ВО "Челябинский государственный университет", РФ, 454001, Челябинск, Братьев Кашириных, 129, avtimofeewa@gmail.com, 89507316117

На основе комплекса значимых показателей микроорганизмов тонкого кишечника: *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Pseudonocardia spp.* и *Rhodococcus spp.* создана математическая модель оценки индивидуального риска развития расстройств аутистического спектра у детей.

**Ключевые слова:** расстройства аутистического спектра, микробная липидомика, ранняя диагностика.

Расстройства аутистического спектра (РАС) представляют собой высоко гетерогенную группу расстройств нейроразвития, что делает идентификацию этих заболеваний очень сложным процессом [1]. Существующие на сегодняшний день методы диагностики РАС, включая различные клинические шкалы (CARS, DSM-5) и отдельные биологические маркеры (IL-1, IFN- $\gamma$ , серотонин, окситоцин и др.) не всегда имеют высокую диагностическую ценность. Развитие омик-технологий (геномики, протеомики, липидомики) позволило проводить комплексную оценку заболеваний, повышая эффективность диагностики. Поэтому целью нашей работы было: на основе показателей липидных маркеров микробиоты тонкого кишечника создать математическую модель оценки индивидуального риска развития РАС у детей.

В исследование включены 40 детей от 3 до 12 лет (средний возраст  $7 \pm 1$  год) с диагнозом детский аутизм (F 84.0). В группу контроля было включено 45 типично развивающихся детей (ТР) от 4 до 13 лет (средний возраст  $9 \pm 1$  год). Структуру и композицию микробиоты тонкого кишечника изучали с помощью метода газовой хроматографии масс-спектрометрии микробных маркеров по количественному содержанию специфических липидных маркеров (карбоновые кислоты, альдегиды, стеролы) микроорганизмов в периферической крови детей. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали критерий Манна-Уитни. Для прогнозирования риска развития РАС у детей применяли аппарат множественной логистической регрессии.

Был проведен сравнительный анализ структуры и композиции микробиоты тонкого кишечника у детей с РАС и в группе контроля (ТР дети). Обнаружено, что структура сообщества бактерий была одинакова в исследуемых группах. Значимые различия наблюдались только в количественном составе некоторых родов и видов микроорганизмов: в тонком кишечнике детей с РАС было статистически значимо повышено количество бактерий родов *Fusobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Pseudonocardia spp.*, *Rhodococcus spp.*, и вида *Staphylococcus aureus*, по сравнению с аналогичными показателями ТР детей. На основе полученных показателей была построена высоко статистически значимая ( $p=0,002$ ) и диагностически эффективная – 68,24% (чувствительность – 80,0%, специфичность – 65,0%) математическая модель риска развития РАС:

$$\text{Логит}(P) = -2,869 + 1,324X_1 + 0,185X_2 + 0,089X_3 + 0,041X_4 + 0,003X_5$$

где  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$  – концентрация *Fusobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Pseudonocardia spp.*, *Rhodococcus spp.* и *Staphylococcus aureus* в крови конкретного обследуемого лица. Вычислив значение (P), можно дать персонифицированный прогноз риска развития РАС. Если  $P < 0,5$  обследуемого следует причислить к группе 0 (отсутствие риска развития осложнений), если  $P > 0,5$  – к группе 1 (наличие риска развития РАС).

Кроме того, для диагностики РАС мы использовали метод пептидных микрочипов со случайными последовательностями – иммуносигнатуру, позволяющий определить профиль циркулирующих антител. Результат - выделено 52 IgG антитела, по которым можно оценить риск развития РАС с 88% диагностической значимостью (данные в печати).

Литература:

1. Huerta M., Lord C. Diagnostic Evaluation of Autism Spectrum Disorders. // *Pediatr. Clin. North. Am.* 2012. Vol.59. №1. P. 103–111

UDC 579.61

## THE USE OF MICROBIAL LIPIDOMICS FOR CONSTRUCTION OF THE MODEL OF INDIVIDUAL RISK OF DEVELOPMENT OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS

**A. Timofeeva**

*Chelyabinsk State University, Russia, 454001, Chelyabinsk, Bratiev Kashirinykh street, 129*

On the basis of a complex of significant indicators of microorganisms of the small intestine: *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Pseudonocardia spp.* and *Rhodococcus spp.*, a mathematical model for estimating the individual risk of development of autism spectrum disorders in children was created.

**Key words:** Keywords: autism spectrum disorders, microbial lipidomics, early diagnosis.

Autism spectrum disorders (ASD) are a highly heterogeneous group of neurodevelopmental disorders that is why the identification of these diseases is very complex process [1]. Current diagnostic methods for ASD, including different clinical scales (CARS, DSM-5) and individual biological markers (IL-1, IFN- $\gamma$ , serotonin, oxytocin, etc.) don't always have high diagnostic value. The development of omic-technologies (genomics, proteomics, lipidomics) made it possible to conduct a comprehensive assessment of diseases, increasing the efficiency of diagnosis. Therefore, the aim of our research was to create a mathematical model for assessing the individual risk of developing ASD in children on the basis of lipid marker indicators of small intestinal microbiota.

40 children aged 3 to 12 years (mean age  $7 \pm 1$  year) diagnosed with Childhood Autism (F 84.0) were included into research. The control group included 45 typically developing children (TDC) from 4 to 13 years (mean age  $9 \pm 1$  year). The structure and composition of the small intestine microbiota were studied using the method of gas chromatography - mass spectrometry of microbial markers for the quantitative content of specific lipid markers (carboxylic acids, aldehydes, sterols) of microorganisms in the peripheral blood of children. The Mann-Whitney test was used to the assessment of significance of differences between groups. To predict the risk of developing ASD in children, the apparatus of multiple logistic regression was used.

A comparative analysis of the structure and composition of the small intestine microbiota in children with ASD and in the control group (TDC) was performed. It was found that the structure of the bacterial community was the same in the study groups. Significant differences were observed only in the quantitative composition of some genera and species of microorganisms: in the small intestine of children with ASD the number of bacteria of the genera *Fusobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Pseudonocardia spp.*, *Rhodococcus spp.*, and *Staphylococcus aureus* was statistically significantly increased, compared to similar indicators TDC. On the basis of the obtained indicators, a highly statistically significant ( $p = 0.002$ ) and diagnostically effective - 68.24% (sensitivity - 80.0%, specificity - 65.0%) mathematical model of risk of ASD development was constructed:

$$\text{Logit}(P) = -2,869 + 1,324X_1 + 0,185X_2 + 0,089X_3 + 0,041X_4 + 0,003X_5$$

where  $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5$  were the concentration of *Fusobacterium spp.*, *Actinomyces spp.*, *Pseudonocardia spp.*, *Rhodococcus spp.* and *Staphylococcus aureus* in the blood of a particular person. Calculating the value ( $P$ ), it was possible to give a personalized prognosis of the risk of developing ASD. If  $P < 0.5$  the examinee should be ranked in group 0 (no risk of complications), if  $P > 0.5$  - to group 1 (risk of ASD development).

In addition, for the diagnosis of ASD, we used the method of peptide microarrays with random sequences - immunosignature, which makes it possible to determine the profile of circulating antibodies. The result: 52 IgG antibodies were detected, which can assess the risk of developing ASD with 88% diagnostic significance (data in print).

*References:*

1. Huerta M., Lord C. *Diagnostic Evaluation of Autism Spectrum Disorders.* // *Pediatr. Clin. North. Am.* 2012. Vol.59. №1. P. 103–111

УДК 602.3:579.864.1:579.873.13

## ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТУР ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ РЕГИОНАЛЬНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Цветкова А.В., Динова Р.К., Хлопова К.В.

ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа, Россия  
450008 Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Ленина, 3  
e-mail: tsvetkovaangela@mail.ru

Исследованы штаммы лакто- и бифидобактерий, выделенные из кишечника здоровых людей Республики Башкортостан, которые могут быть использованы в качестве основы для создания новых пробиотических препаратов для коррекции дисбиотических нарушений микрофлоры населения данного региона.

**Ключевые слова:** лактобактерии, бифидобактерии.

В настоящее время для профилактики и лечения дисбактериоза желудочно-кишечного тракта применяют препараты–пробиотики. Наиболее перспективными препаратами пробиотиками являются лакто– и бифидобактерии, которые обладают высокой биологической и функциональной активностью, что определяет их практическое использование в качестве пробиотиков и в производстве пищевых продуктов [1].

Микрофлора людей, проживающих в разных регионах, различающихся неоднородным климатом, бытовыми условиями, рационами питания и т.д., не является одинаковой по спектру встречаемости и количеству. В нашей работе была проведена селекция антагонистически активных штаммов лакто– и бифидобактерий от здоровых людей Республики Башкортостан по набору свойств: морфо-тинкториальных, культуральных, биохимических, нуклеотидной последовательности гена 16S рPHK, антагонистической активности к патогенным и условно–патогенным микроорганизмам [2], адгезивной способности [3].

В результате изучения антагонистической активности было отобрано 6 штаммов лактобактерий и 3 штамма бифидобактерий, проявивших антагонизм в методе перпендикулярных штрихов по отношению к микроорганизмам *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, антагонистически активных по сравнению с контрольными производственными штаммами *L. plantarum* и *B. bifidum*, выделенных от пробиотиков Лактобактерин и Бифидобактерин.

В результате биохимической идентификации с помощью тест системы Api (bio Mérieux) и генетической идентификации по нуклеотидной последовательности гена 16S рPHK шести антагонистически активных штаммов лактобактерий выявлено, что 2 штамма принадлежат к виду *L. acidophilus*, 2 – к *L. plantarum*, 1 – к *L. rhamnosus*, 1 – к *L. crispatus*. Биохимическая и генетическая идентификация выделенных из кишечника антагонистически активных бифидобактерий показала, что 1 штамм относится к виду *B. longum*, 1 – к *B. bifidum*, 1 – к *B. adolescentis*.

Проведенное сравнение показателей процента и индекса адгезии лакто– и бифидобактерий к монокультуре клеток обнаружило, что все исследуемые штаммы обладают выраженной адгезией к эпителиальным клеткам и образуют биопленку на поверхности эпителиальных клеток. Для *L. crispatus* процент адгезии 100% и индекс адгезии  $38 \pm 6$ , для *L. acidophilus* –  $95 \pm 2\%$  и  $26 \pm 4$ , для *L. rhamnosus* –  $87 \pm 3\%$  и  $16 \pm 5$ , для *L. plantarum* –  $83 \pm 5\%$  и  $12 \pm 7$ , для *B. longum* –  $68 \pm 2\%$  и  $15 \pm 6$ , для *B. bifidum* –  $93 \pm 5\%$  и  $9 \pm 2$ , для *B. adolescentis* –  $84 \pm 3\%$  и  $11 \pm 1$ .

В итоге охарактеризованные по широкому набору фено- и генотипических признаков штаммы лактобифидобактерий депонированы в рабочей коллекции кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии БГМУ для перспективы создания региональных пробиотических препаратов, которые основываясь на принципах персонализированной медицины будут более эффективными для жителей нашего региона, при производстве препаратов различного назначения – в медицине, пищевых технологиях, биотехнологии.

Литература:

1. Chen C.C., Walker W.A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states // *Advances in Pediatrics*. 2005. № 52. P. 77-113.
2. Ермоленко Е.И., Исаков В.А., Ждан-Пушкина С.Х., Тец В.В. Количественная оценка антагонистической активности лактобацилл // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2004. №5. с.94-98.
3. Reid G. Probiotic Lactobacilli for urogenital health in women // *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2008. 42(3). P. 234-236.

UDC 602.3:579.864.1:579.873.13

## THE STUDY OF CULTURES OF LACTO- AND BIFIDOBACTERIA TO CREATE A REGIONAL PROBIOTIC PREPARATIONS

**Tsvetkova A.V., Dinova R.K., Hlopova K.V.**

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia  
 450008, Republic of Bashkortostan, Ufa, Lenin street, 3  
 e-mail: tsvetkovaangela@mail.ru

We investigated strains of lacto- and bifidobacteria isolated from intestines of healthy people of the Republic of Bashkortostan which can be used as a basis for creation of new probiotic preparations for correction of dysbiotic disorders of microflora of the population of this region.

**Key words:** lactobacteria, bifidobacteria.

Currently probiotic preparations are used for the prevention and treatment of gastrointestinal dysbiosis. The most promising probiotic preparations are lacto- and bifidobacteria, which possess high biological and functional activity, which determines their practical use as probiotics and in food production [1].

Microflora of people living in different regions, different heterogeneous climate, living conditions, diets, etc., is not the same in the spectrum of occurrence and quantity. In our work we conducted selection of antagonistically active strains of lacto- and bifidobacteria from healthy people of the Republic of Bashkortostan on a set of properties: morphological and tinctorial, cultural, biochemical, nucleotide sequence of 16s rRNA gene, antagonistic activity in relation to pathogenic and opportunistic pathogenic bacteria [2], adhesive ability [3].

As a result of the study of antagonistic activity, we selected 6 strains of lactobacteria and 3 strains of bifidobacteria that showed antagonism in the method of perpendicular strokes in relation to microorganisms *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, antagonistically active in comparison with control production strains of *L. plantarum* and *B. bifidum* isolated from probiotics Laktobakterin and Bifidobakterin.

As a result of biochemical identification by Api test system (bio Mérieux) and genetic identification by nucleotide sequence of 16s rRNA gene of six antagonistically active lactobacteria strains, we found out that two strains belong to the species *L. acidophilus*, 1 – to *L. plantarum*, 1 – to *L. rhamnosus*, 1 – to *L. crispatus*. Biochemical and genetic identification of isolated from the intestine of antagonistic active bifidobacteria showed that one strain belongs to the species *B. longum*, 1 – to *B. bifidum*, 1 – to *B. adolescentis*.

The comparison of percentages and index of adhesion of lacto- and bifidobacteria to cell culture monolayer revealed that all studied strains possess expressed adhesion to epithelial cells and form biofilm on the surface of epithelial cells. For *L. crispatus* 100% adhesion percentage and 38±6 adhesion index, for *L. acidophilus* – 95±2% and 26±4, for *L. rhamnosus* – 87±3% and 16±5, for *L. plantarum* – 83±5% and 12±7, for *B. longum* – 68±2% and 15±6, for *B. bifidum* – 93±5% and 9±2, for *B. adhesion* – 84±3% and 11±1.

As a result, characterized by a wide range of phenotypic and genotypic characteristics strains of lacto- and bifidobacteria deposited in the working collection of the Department of fundamental and applied Microbiology BSMU for the prospects of creating regional probiotic drugs that are based on the principles of personalized medicine will be more effective for residents of our region in the production of drugs for various purposes – in medicine, food technology, biotechnology.

### References:

1. Chen C.C., Walker W.A. Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states // *Advances in Pediatrics*. 2005. № 52. P. 77-113.
2. Ermolenko E.I., Isakov V.A., Zhdan-Pushkina S.H., Tec V.V. Quantitative evaluation of antagonistic activity of lactobacilli // *Journal of Microbiology, epidemiology and Immunobiology*. 2004. №5. P.94-98.
3. Reid G. Probiotic Lactobacilli for urogenital health in women // *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2008. 42(3). P. 234-236.

УДК 616.34-002

## МЕТАБОЛОМНЫЙ ПОДХОД К ВЫЯВЛЕНИЮ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОМАРКЕРОВ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

Ситкин С.И.<sup>1,2</sup>, Вахитов Т.Я.<sup>1</sup>, Демьянова Е.В.<sup>1</sup>, Шалаева О.Н.<sup>1</sup>, Утсаль В.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА России, Санкт-Петербург  
197110, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Пудожская, д. 7  
e-mail: lenna\_22@mail.ru

<sup>2</sup> СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Институт токсикологии ФМБА России, Санкт-Петербург

**Ключевые слова:** биомаркеры, ГХ-МС, язвенный колит, метаболом, целиакия, микробные метаболиты.

Цель исследования: выявление потенциальных биомаркеров хронического воспаления в кишечнике путем изучения метаболома сыворотки крови.

Материалы и методы: В исследование было включено 125 пациентов: 40 пациентов с язвенным колитом, 43 пациента с целиакией и 42 практически здоровых добровольца. Состав метаболома сыворотки крови определялся с помощью метода газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС).

Результаты: Из 93 идентифицированных соединений, общих для всех пациентов, 28 метаболитов имели микробное происхождение. У пациентов с язвенным колитом концентрации молочной, 2-гидроксимасляной, 3-гидроксиизомасляной, 2-гидроксиизовалериановой, 3-гидроксикоричной, янтарной, бензойной и пара-гидроксибензилуксусной кислот в сыворотке крови были значимо повышены по сравнению со здоровыми. В свою очередь, уровни капроновой, линолевой и эйкозадиеновой кислот при язвенном колите были значимо ниже, чем в группе здоровых. Концентрации 2-гидроксимасляной и 2-гидроксиизовалериановой кислот у больных язвенным колитом были значимо повышены и по сравнению с пациентами с целиакией. Концентрации капроновой, линолевой и гликолевой кислот при язвенном колите были значимо ниже, чем в группе целиакии. У пациентов с целиакией концентрации стеариновой, 2-гидроксиизовалериановой, янтарной, фумаровой и бензойной кислот были значимо повышены по сравнению со здоровыми добровольцами, а уровень арахидоновой кислоты был значимо повышен только по сравнению с больными язвенным колитом. Липогенный индекс (C16:0/C18:2n-6) был значимо повышен у пациентов с язвенным колитом по сравнению как со здоровыми добровольцами, так и с больными целиакией. Индекс активности элонгазы ELOVL6 (C18:0/C16:0) и отношение уровня стеариновой кислоты к уровню линолевой кислоты (C18:0/C18:2n-6) у пациентов с язвенным колитом были значимо повышены по сравнению со здоровыми. Отношение уровня арахидоновой кислоты к уровню эйкозадиеновой кислоты (C20:4n-6/C20:2n-6) было повышено в обеих группах больных. На фоне дополнительного применения масляной кислоты в комбинации с инулином отмечалось значимое понижение сывороточных концентраций провоспалительных метаболитов микробного происхождения – янтарной кислоты (как у больных язвенным колитом, так и у пациентов с целиакией) и 2-гидроксиизовалериановой кислоты (у больных целиакией). Кроме того, у пациентов с язвенным колитом значимо повышался уровень линолевой и эйкозадиеновой кислот.

Выводы: При хронических воспалительных процессах в кишечнике наблюдаются значимые изменения сывороточных концентраций метаболитов микробного и эндогенного происхождения, отражающие нарушения в соответствующих метаболических путях (гликолиз, цикл Кребса, окисление и биосинтез жирных кислот, метаболизм кетоновых тел, метаболизм триптофана, фенилаланина и тирозина, микробный метаболизм). По результатам ROC-анализа, некоторые из этих метаболитов (преимущественно микробного или смешанного происхождения), а также новый метаболомный индекс (отношение уровня арахидоновой кислоты к уровню эйкозадиеновой кислоты), отражающий баланс между провоспалительными и противовоспалительными компонентами пула ω-6-ПНЖК, могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры хронического воспаления в кишечнике. Снижение уровня провоспалительных метаболитов микробного происхождения в сыворотке крови свидетельствует о возможности эффективной коррекции метаболического дисбиоза с помощью метабитиков.



UDC 616.34-002

## A METABOLOMICS APPROACH TO IDENTIFY POTENTIAL BIOMARKERS OF CHRONIC INFLAMMATION

Sitkin S.I.<sup>1,2</sup>, Vakhitov T.Ya.<sup>1</sup>, Demyanova E.V.<sup>1</sup>, Shalaeva O.N.<sup>1</sup>, Utsal V.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia  
197110, Russia, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7  
e-mail: sitkins@yandex.ru

<sup>2</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg

<sup>3</sup> Institute of Toxicology of FMBA, St. Petersburg

**Key words:** biomarkers, GC-MS, ulcerative colitis, metabolite, celiac disease, microbial metabolites.

**Aim:** to identify potential biomarkers of chronic intestinal inflammation by serum metabolomics analysis.

**Methods:** 40 patients with mild-to-moderate active left-sided ulcerative colitis (UC), 43 patients with celiac disease (CD) in remission on a gluten-free diet and 42 healthy controls (HC) (125 patients in total) were enrolled in the study. Serum metabolomic assays were conducted using the GC-MS.

**Results:** 28 out of 93 identified metabolites were of microbial origin. In serum of UC patients lactic acid, 2-hydroxybutyric acid (2-HBA), 3-hydroxyisobutyric acid (3-HIBA), 2-hydroxyisovaleric acid (2-HIVA), 3-hydroxycinnamic acid, succinic acid, benzoic acid and 4-hydroxyphenylacetic acid (4-HPAA) levels were significantly increased compared to HC. Serum levels of caproic acid, linoleic acid and eicosadienoic acid (EDA) in UC were significantly lower than in HC group. 2-HBA and 2-HIVA levels in UC patients were significantly increased as compared to CD patients. Serum levels of caproic acid, linoleic acid and glycolic acid in UC were significantly lower than in CD group. Serum of CD patients showed significant increases in stearic acid, 2-HIVA, succinic acid, fumaric acid and benzoic acid compared to HC. Serum arachidonic acid (AA) level in CD was significantly elevated compared to UC patients only. De novo lipogenesis index (DNL) (C16:0/C18:2n-6) was significantly elevated in UC patients compared to both HC and CD patients. The ELOVL6 elongase activity index (C18:0/C16:0) and the stearic acid/linoleic acid ratio (C18:0/C18:2n-6) in UC patients were significantly increased compared to HC. The ratio of AA to EDA (C20:4n-6/C20:2n-6) was increased in both UC and CD groups. Butyrate plus inulin significantly lowered serum levels of pro-inflammatory succinic acid (in both UC and CD patients) and 2-hydroxyisovaleric acid (in CD) and restored the lowered serum levels of linoleic acid and EDA in UC patients.

**Conclusions:** Significant changes in serum levels of microbial and endogenous metabolites, reflecting some metabolic pathways disturbances (glycolysis, TCA cycle, fatty acid metabolism, ketone body metabolism, phenylalanine, tyrosine and tryptophan metabolism, microbial metabolism) are observed in chronic intestinal inflammation. ROC curve analysis showed that some of these metabolites of microbial or mixed origin, as well as a new metabolomic index (the ratio of arachidonic acid to eicosadienoic acid, C20:4n-6/C20:2n-6), reflecting the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory components of the omega-6 fatty acid pool, may be considered as potential biomarkers of chronic intestinal inflammation. Reduction of pro-inflammatory microbial metabolites in serum indicates the ability of metabiotics (e.g. butyrate + inulin) to correct metabolic dysbiosis.

УДК: 577.29; 579.25

## МИКРОБИОМ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ДЕТЕЙ И АУТИЗМ

Ребриков Д.В.,<sup>1</sup> Аверина О.В.,<sup>1,2</sup> Ковтун А.С.,<sup>2</sup> Даниленко В.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1.

<sup>2</sup> Институт общей генетики Им. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, д.3  
e-mail: olgavr06@mail.ru

Проведен сравнительный метагеномный анализ кишечных микробиом детей с расстройством аутистического спектра и контрольной группы здоровых детей по таксономическому составу и нейрометаболическому потенциалу. Выявленные отличия коррелируют с тяжестью заболевания.

**Ключевые слова:** расстройство аутистического спектра; кишечная микробиота; микробиом; метагеномный анализ; нейрометаболиты.

Расстройство аутистического спектра (РАС) сегодня является распространенным ранним неврологическим заболеванием, которое выявляется у детского населения с частотой 1% - 2%. РАС характеризуется определенными нарушениями в вербальной и невербальной коммуникации, социальных взаимодействий. В последние годы, наряду с различными факторами, приводящими к возникновению РАС, рассматривается кишечная микробиота человека. Сегодня известно, что микробиота кишечника находится в двунаправленной коммуникации с мозгом человека. Влияние микробиоты на мозг осуществляется через действие продуцируемых нейроактивных метаболитов [Аверина и Даниленко, 2017]. Различные независимые исследования выявили у пациентов с РАС специфические изменения в составе кишечной микробиоты [Ding et al., 2017]. Все опубликованные данные были получены с использованием анализа секвенированных генов 16S rPHK от представителей кишечной микробиоты человека. Цель нашего исследования заключалась в проведении полного метагеномного анализа микробиом кишечника здоровых детей и с РАС.

Проведен сравнительный метагеномный анализ полностью секвенированной общей бактериальной ДНК микробиом кишечника детей раннего возраста контрольной группы здоровых детей (норма) и двух групп детей с различным порогом аутичности (выше и ниже). Секвенирование микробиомной ДНК проводили на приборе Illumina HiSeq 2500. Для таксономического анализа метагеномов использовались программы MetaPhlan и Kraken. Полученные данные указывают для большинства родов бактерий, выявленных в сравниваемых метагеномах, схожесть в количественном составе. Однако для ряда родов наблюдаются различия в содержании. Разница в численности выявляется для бактерий родов: Alistipes, Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Dorea, Dialister, Escherichia coli, Desulfovibrio, Veillonella, Parabacteroides, Akkermansia, Collinsella, Blautia, что соответствует опубликованным данным. Интересно, что наблюдается разница не только в сравнении с контролем, но и между метагеномными данными детей с РАС из различных групп. Выявлены высокие количественные показатели для бактерий вида *Prevotella copri* в составе метагеномов детей с РАС с менее выраженными симптомами, однако, у 5 детей с высоким порогом аутичности эти бактерии или не выявлены, или содержатся в незначительном количестве. Также, в метагеномах детей с РАС наблюдается снижение количества бактерий родов *Anaerostipes*, *Ruminococcus* и *Roseburia*. С использованием разработанного ранее алгоритма поиска и каталога ортологов 17 генов в исследуемых метагеномах был проведен поиск генов, участвующих в метаболизме нейроактивных соединений. Полученные данные показывают основные отличия по содержанию генов, кодирующих ферменты для синтеза гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), мелатонина, уксусной, масляной, пропионовой кислот, спермидина и конъюгированной линолевой кислоты, в составе метагеномов детей с РАС и нормы. Не выявлены гены, продукты которых участвуют в синтезе серотонина, допамина, оксида азота, тирамина. Между метагеномами от различных групп детей с РАС наблюдается разница в количестве генов, участвующих в продукции ГАМК и мелатонина.

### Литература:

Аверина О.В., Даниленко В.Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // Микробиология. - 2017. - том 86- № 1-С. 1-19.

Ding H.T., Taur Y., Walkup J.T. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings // J. Autism Dev. Disord. 2017. Vol. 47. P. 480-489. 577.29; 579.25

UDC: 577.29; 579.25

## GUT MICROBIOME OF CHILDREN AND AUTISM

Rebrikov D. V.,<sup>1</sup> Averina O. V.<sup>1,2</sup>, Kovtun A. S.<sup>2</sup>, Danilenko V. N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia, 117997, Moscow, Ostrovityanova str., 1.

<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 119991, Moscow, Gubkina str., 3  
 e-mail: olgavr06@mail.ru

A comparative metagenomic analysis of gut microbiomes of children with autism spectrum disorder and control group of healthy children on taxonomic composition and neurometabolic potential was carried out. The revealed differences correlate with disease severity.

**Key words:** autism spectrum disorder; gut microbiota; microbiome; metagenomic analysis; neurometabolites.

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder that today is detected in the child population at 1% - 2% frequency. ASD is characterized by impaired verbal or nonverbal communication and social interactions. In recent years, along various factors that lead to the occurrence of ASD, the human gut microbiota is considered. Today it is known that gut microbiota have bidirectional communication with the human brain. The impact of microbiota on the brain is realized through the action of produced neuroactive metabolites [Averina and Danilenko, 2017]. A number of bacteria representing the gut microbiota have an ability to produce neurotransmitters, such as serotonin, dopamine, norepinephrine, GABA, acetylcholine, and nitric oxide [Averina and Danilenko, 2017]. Various independent studies have revealed specific changes in the composition of gut microbiota in patients with ASD [Ding et al., 2017]. All published data were obtained using the analysis of 16S rRNA sequenced genes from members of the human gut microbiota. The aim of our study was to perform a complete metagenomic analysis of the gut microbiota of healthy children and children with ASD.

A comparative metagenomic analysis of the fully sequenced common bacterial DNA of the gut microbiome of infants of the control group healthy children (norm) and two groups of children with different autism threshold (above and below) was carried out. Sequencing of microbiome's DNA was performed on the Illumina HiSeq 2500. MetaPhlAn and Kraken programs were used for taxonomic analysis of metagenomes. The obtained data indicate the similarity in the quantitative composition for most genera of bacteria found in the compared metagenomes. However, for a number of genera there are differences in content. The difference in abundance is found for bacteria of genera: Alistipes, Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium, Dorea, Dialister, Escherichia coli, Desulfovibrio, Veillonella, Parabacteroides, Akkermansia, Collinsella, Blautia which corresponds to the published data. It is interesting that there is a difference not only in comparison with the control, but also between the metagenomic data of children with ASD from different groups. High quantitative parameters indices for *Prevotella copri* in the metagenomes composition of autistic children with less expressed symptoms have been revealed, however, in 5 children with a high autism threshold, these bacteria either are not identified, or are contained in a small amount. Also, the number of bacteria of the genera *Anaerostipes*, *Roseburia* and *Ruminococcus* decreased in the metagenomes of children with ASD. Using the previously developed algorithm of search and the catalog of orthologues of 17 genes, the search for genes involved in the metabolism of neuroactive compounds, was carried out in the studied metagenomes. The obtained data show the main differences in the content of genes encoding enzymes for the synthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA), melatonin, acetic, butyric, propionic acids, spermidine and conjugated linoleic acid, as a part of metagenomes of children with ASD and norm. Genes whose products take part in the synthesis of serotonin, dopamine, nitric oxide, and tyramine were not detected. Between metagenomes from different groups of children with ASD, there is a difference in the number of genes involved in the production of GABA and melatonin.

### References:

- Averina O.V., Danilenko V.N. Human Intestinal Microbiota: Role in Development and Functioning of the Nervous System // *Microbiology*. 2017. Vol. 86. № 1. P.1-19.
- Ding H.T., Taur Y., Walkup J.T. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings // *J. Autism Dev. Disord.* 2017. Vol. 47. P.480-489.

УДК 543.95, 57.083.18

## ОБНАРУЖЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ LNA ЗОНДОВ

Соловьева М.Н., Гудов В.П., Ткачук А.П., Гуцин В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия  
123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18  
e-mail: masha\_solovyova@mail.ru

Проведены эксперименты по связыванию флуоресцентно-меченого LNA зонда с рРНК клеток бактерий *Escherichia coli*, изучена специфичность связывания используемого зонда. Исследовано влияние различных условий реакции на процесс флуоресцентной гибридизации. С помощью метода флуоресцентной микроскопии зарегистрирован флуоресцентный сигнал.

**Ключевые слова:** флуоресцентная гибридизация in situ (FISH), закрытые нуклеиновые кислоты (LNA), бактериальные патогены, рРНК.

В настоящее время в клинической практике наибольшую актуальность приобретает задача, связанная с экспресс типированием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в частности, находящихся в биологических жидкостях человека (образцах крови или слюны). Для решения этой проблемы предложен метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH), который позволит вне условий лаборатории и без использования дорогостоящей техники достоверно и за достаточно короткие сроки (в течение 2-3 часов) обнаружить целевые микроорганизмы в анализируемом образце [1,2]. Данный подход позволяет детектировать бактериальные патогены за счет связывания флуоресцентно-меченых зондов с рибосомальной РНК (рРНК) искомым бактерий.

Для проведения гибридизации широкое распространение получили зонды на основе аналогов ДНК – закрытых нуклеиновых кислот (LNA, locked nucleic acid) (рис. 1а). По сравнению с ДНК-ДНК дуплексами данные структуры образуют дуплексы с большей температурой плавления, при этом для проведения реакций не требуются особые условия, поскольку LNA обладают высокой растворимостью в стандартных буферных растворах, используемых в методе FISH. Кроме этого, синтез зондов с заданной структурой может быть осуществлен на стандартных автоматических олигонуклеотидных синтезаторах, компоненты для синтеза коммерчески доступны и имеют приемлемую стоимость [3,4].

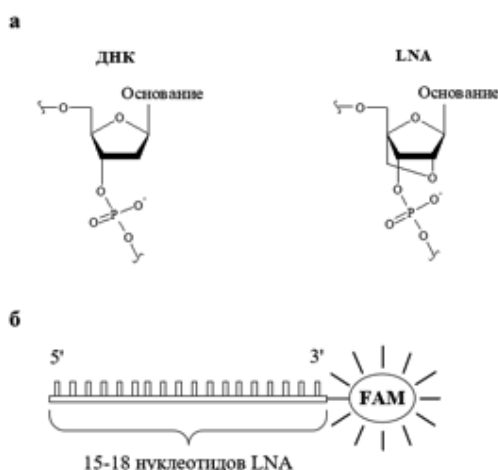


Рис. 1. Структуры ДНК и LNA мономеров (а). Схематичное изображение LNA зонда (б).

В результате анализа литературных данных, была выбрана олигонуклеотидная последовательность для LNA зонда, комплементарного к фрагменту рРНК *Escherichia coli*, и базовый порядок действий для проведения флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) [4-6]. На 3'-конце зонда присоединена флуоресцентная метка – молекула 5(6)-карбоксифлуоресцеина (FAM) (рис. 1б). В результате выполнения работы осуществ-

в ряд экспериментов по связыванию флуоресцентно-меченого LNA зонда с 16S РНК клеток бактерий *Escherichia coli*, изучена специфичность связывания используемого зонда в условиях присутствия клеток других видов (*Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhimurium*), составлен и проверен новый эффективный протокол гибридизации *in situ*. С помощью метода флуоресцентной микроскопии (микроскоп Axiovert 200M, программное обеспечение Axiovision Rel. 4.8) зарегистрирован флуоресцентный сигнал в каналах проходящего света и флуоресцентном (520 нм) (рис. 2). Изучено влияние различных условий реакции на связывание рРНК с LNA зондами и выбраны условия, позволяющие получить наибольшее соотношение сигнал/шум при анализе картин флуоресценции.

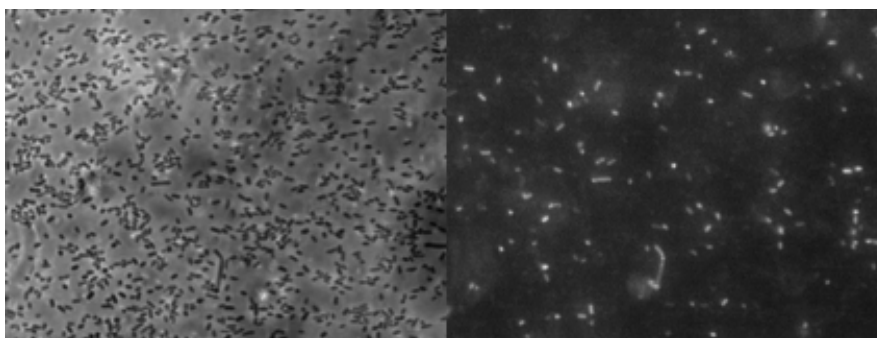


Рис. 2. Пример результатов эксперимента с клетками *E. coli*, *S. typhimurium* и *P. aeruginosa* – изображения с флуоресцентного микроскопа в проходящем свете и во флуоресцентном канале (левое и правое изображение, соответственно).

#### Литература:

1. Amann R., Fuchs B.M., Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization // *Env. biotechnology*. 2001. Vol. 12. P. 231- 236.
2. Frickmann H., Zautner A.E., Moter A. et al. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review // *Crit. Rev. Microbiol.* 2017. Vol. 43. № 3. P. 263-293.
3. Silaharoglu A.N., Tommerup N., Vissing H. FISHing with locked nucleic acids (LNA): evaluation of different LNA/DNA mixmers // *Molecular and Cellular Probes*. 2003. Vol. 17. P. 165-169.
4. Fontenete S., Carvalho D., Guimaraes N. et al. Application of locked nucleic acid-based probes in fluorescence *in situ* hybridization // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. Vol. 100. № 13. P. 5897-5906.
5. Pery-O'Keefe H., Rigby S., Oliveira K. et al. Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method // *J. Microbiol. Methods*. 2001. Vol. 47. P. 281-292.
6. Williams E., Lin M.H., Harbison S. et al. The development of a method of suspension RNA-FISH for forensically relevant epithelial cells using LNA probes // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. Vol. 9. P. 85-92.

UDC 543.95, 57.083.18

## DETECTION OF BACTERIAL PATHOGENS USING FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION WITH LNA PROBES

Solovyova M.N., Gudov V.P., Tkachuk A.P., Gushchin V.A.

The Federal State Budgetary Institution "National Research Center for Epidemiology and Microbiology named by Honorable Academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia  
 123098, Moscow, Gamaleya street, 18.  
 e-mail: masha\_solovyova@mail.ru

Experiments to bind of a fluorescently labeled LNA probe to the rRNA of *Escherichia coli* cells were carried out, the specificity of the binding used probe was studied. The influence of various reaction conditions on the process of FISH was investigated. A fluorescent signal was detected using fluorescence microscopy.

**Key words:** fluorescence *in situ* hybridization (FISH), locked nucleic acids (LNA), bacterial pathogens, rRNA.

Today the most actual problem in clinical practice is the problem associated with the rapid detection of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms in particular in biological samples (blood or sputum). To solve this problem, a method of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) was proposed, that allows outside the laboratory and without the use of expensive technology to detect the target microorganisms in the analyzed

sample for a short time (within 2-3 hours) [1,2]. This approach allows to detect of bacterial pathogens by binding fluorescently-labeled probes to ribosomal RNA (rRNA) of the target bacteria.

To carry out hybridization, probes based on analogues of DNA – locked nucleic acids (LNA) were widely used (Fig. 1a). Compared to DNA-DNA duplexes, these structures form duplexes with a higher melting point, the reactions do not require special conditions, since LNAs have high solubility in standard buffer solutions used in the FISH method. Besides the synthesis of probes with a specific structure can be easily carried out using standard automatic oligonucleotide synthesizers, the components for synthesis are commercially available and have a reasonable cost [3,4].

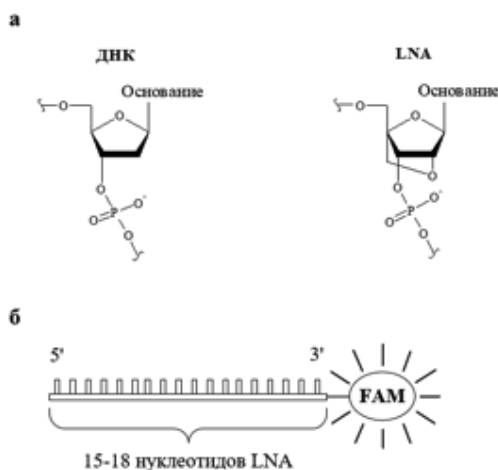


Fig. 1. Structures of DNA and LNA monomers (a). Schematic representation of the LNA probe (b).

As a result of the analysis of the literature data, an oligonucleotide sequence was selected for the LNA probe complementary to Escherichia coli rRNA fragment and the basic procedure for fluorescence in situ hybridization (FISH) was chosen [4-6]. At the 3'-end of the probe contains a fluorescent label – a molecule of 5-(6)-carboxyfluorescein (FAM) (Fig. 1b). As a result of the work, a number of experiments on the binding of a fluorescently labeled LNA probe to 16S RNA Escherichia coli cells were carried out, the specificity of the binding of the probe under the conditions of the presence of cells of other species (*Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*) was studied, a new effective FISH protocol was composed and tested. Using fluorescence microscopy (Axiovert 200M microscope, Axiovision Rel. 4.8 software), a fluorescent signal in the transmitted light and fluorescent channels (520 nm) was registered (Fig. 2). The effect of different reaction conditions on the binding of rRNA to LNA probes was researched, conditions allowed obtaining the highest signal-to-noise ratio in the analysis of fluorescence images were chosen.

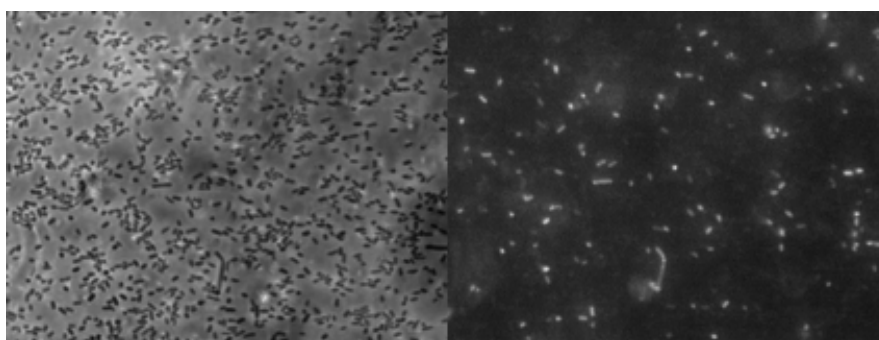


Fig. 2. Example of experimental results with *E. coli*, *S. typhimurium* and *P. aeruginosa* cells – images from a fluorescent microscope in transmitted light and in a fluorescent channel (left and right image, respectively).

#### References:

1. Amann R., Fuchs B.M., Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization // *Env. biotechnology*. 2001. Vol. 12. P. 231-236.
2. Frickmann H., Zautner A.E., Moter A. et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review // *Crit. Rev. Microbiol.* 2017. Vol. 43. № 3. P. 263-293.
3. Silaharoglu A.N., Tommerup N., Vissing H. FISHing with locked nucleic acids (LNA): evaluation of different LNA/DNA mixmers // *Molecular and Cellular Probes*. 2003. Vol. 17. P. 165-169.
4. Fontenete S., Carvalho D., Guimaraes N. et al. Application of locked nucleic acid-based probes in fluorescence in situ

- hybridization // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. Vol. 100. № 13. P. 5897-5906.
5. Pery-O'Keefe H., Rigby S., Oliveira K. et al. Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method // *J. Microbiol. Methods.* 2001. Vol. 47. P. 281-292.
6. Williams E., Lin M.H., Harbison S. et al. The development of a method of suspension RNA-FISH for forensically relevant epithelial cells using LNA probes // *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014. Vol. 9. P. 85-92.

УДК 579.22; 615.33

## РАЗРАБОТКА ПСИХОБИОТИКОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ДЕПРЕССИВНЫХ СОСТОЯНИЙ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Юнес Р.А., Полуэктова Е.У., Козловский Ю.Е., Ковалёв Г.И., Даниленко В.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Российской академии наук  
 119333, Москва, ул. Губкина д.3  
 email: romanyunes@gmail.com

Проверена коллекция из 141 штамма лактобацилл и бифидобактерий на способность синтезировать гамма-аминомасляную кислоту *in vitro* из её предшественника глутамата натрия. Отобраны 2 штамма видов *L. plantarum* и *B. adolescentis* синтезирующие максимальное количество ГАМК среди других штаммов а также обладающие антиоксидантными и другими пробиотическими свойствами. Создан препарат на основе отобранных штаммов и проверена его эффективность на животных.

**Ключевые слова:** психобиотики; лактобациллы; бифидобактерии; гамма-аминомасляная кислота

Термин психобиотик был введён в 2012 году ирландским нейробиологом Джоном Крайаном совместно с психиатром Тедом Динаном для обозначения живых организмов, употребление которых в адекватных количествах способно облегчить состояние пациентов, страдающих психиатрическими заболеваниями, посредством воздействия на ось-кишечник-мозг [1]. Толчком к развитию подобных исследований стало открытие огромного видового разнообразия резидентной микробиоты кишечника человека и животных. Пересадка кишечной микробиоты животным приводила к передаче последним ряда свойств донора, а её отсутствие у гнотобионтов являлось причиной ряда физиологических нарушений.

По данным ВОЗ, депрессией страдает более 300 миллионов человек по всему миру, число больных имеет тенденцию к стремительному росту, в связи с чем актуальной задачей является поиск новых препаратов и подходов к лечению данного заболевания. Интерес к психобиотикам вызван перспективностью их применения в качестве альтернативной или адъювантной терапии депрессивных расстройств. Их действие может быть направлено на многие аспекты патофизиологии депрессии: хроническое неспецифическое воспаление, чрезмерная активация гипоталамо-гипофизарно-адреналовой оси, нарушение проницаемости кишечного барьера.

Сегодня в мире обсуждаются различные подходы к поиску штаммов бактерий-психобиотиков, который ведётся в первую очередь среди лактобацилл и бифидобактерий. Возможными критериями отбора таких штаммов являются способность синтезировать короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК), триптофан и другие нейроактивные соединения [2]. При отборе учитываются и другие критерии, такие как иммуномодулирующие свойства, способность укреплять кишечный барьер и снижать уровень гормонов стресса. В будущем возможно и применение персонализированных психобиотиков. Скрининг следует начать *in vitro*, затем *in vivo* после чего отобранные штаммы тестируются на людях. В 2016 году, в Канаде выпущен первый препарат-психобиотик Probio'Stick® для применения при расстройствах связанных со стрессом.

В лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики РАН проведена работа по многоступенчатому отбору потенциальных штаммов бактерий-психобиотиков среди представителей видов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, выделенных из кишечника здоровых людей – жителей центрального региона Российской Федерации. На первом этапе были отобраны штаммы, превосходящие остальные по способности синтезировать ГАМК из её предшественника глутамата натрия. Продукция ГАМК, наличие генов необходимых для её синтеза и их экспрессия были изучены в ходе работы. Отобранные штаммы были охарактеризованы и по антиоксидантной активности. ДНК отобранных штаммов была секвенирована и проанализирована на наличие "пробиотических" генов, связанных с синтезом КЦЖК, иммуномодулирующими свойствами и др. На основе проведённого скрининга были отобраны два штамма *Lactobacillus plantarum* и *Bifidobacterium adolescentis*,

которые служили основой для разработки препарата-психобиотика. Антидепрессивный эффект препарата был подтверждён в поведенческом тесте Порсолта на мышах линии Balb/c. Опыты на крысах линии Спрэг-Доули позволяют предполагать, что эффект препарата связан с его способностью снижать уровень гормона пролактина в плазме крови. Разработанный препарат планируется проверить в рамках доклинических исследований, а также зарегистрировать как биологически активную добавку.

*Литература:*

1-Shanahan F., Dinan T.G., Ross P., Hill C., *Probiotics in transition//Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012. Vol. 10. №11. P. 1220-4.

2-Yunes R.A., Poluektova E.U., Dyachkova M.S., Klimina K.M., Kovtun A.S., Averina O.V., Orlova, V.S., Danilenko V.N., *GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota// Anaerobe.* 2016. Vol. 42. 197-204.

UDC 579.22; 615.33

## DEVELOPMENT OF PSYCHBIOTICS FOR PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF DEPRESSIVE DISORDERS OF VARIOUS ETIOLOGIES

**Yunes R.A., Poluektova E.U., Kozlovsky Y.E., Kovalev G.I., Danilenko V.N.**

*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
119333 Moscow, Gubkin St.3  
email: romanyunes@gmail.com*

We screened a collection of 141 lactobacilli and bifidobacteria strains for the ability to synthesize gamma-aminobutyric acid in vitro from its precursor glutamate sodium. Two strains belonging to *L.plantarum* and *B.adolescentis* species were selected as the most efficient producers of GABA and possessing antioxidant and other probiotic properties. Based on the selected strains, we created a drug and tested it on animals.

**Key words:** psychobiotic; lactobacilli; bifidobacteria; gamma-aminobutyric acid.

The term psychobiotic was coined in 2012 by the Irish neuroscientist John Cryan in conjunction with the psychiatrist Ted Dinan, to describe living organisms that, when ingested in adequate amounts can alleviate the condition of patients suffering from psychiatric illnesses via the brain-gut axis [1]. The development of this industry is owed to the discovery of the huge diversity of microbes living in the gut of humans and animals. Gut microbiota transplantation to animals resulted in the transfer of a number of properties of the donor to the latter, and its absence in gnotobionts became a cause of many physiological disturbances.

According to the WHO, more than 300 million people worldwide suffer from depression; the number of patients has a tendency to grow rapidly, therefore, it is important to find new drugs and approaches to treat this disease. The interest in psychobiotics is explained by the prospects of their use as an alternative or adjuvant therapy for depressive disorders. Psychobiotics can target many aspects of the pathophysiology of depression: low grade inflammation, excessive activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, impaired permeability of the gut barrier.

Today, different approaches to the selection of psychobiotic strains, which is carried out primarily among lactobacilli and bifidobacteria, are discussed in the world. Some of the selection criteria for such strains are the ability to synthesize short-chain fatty acids (SCFA), gamma-aminobutyric acid (GABA), tryptophan and other neuroactive compounds [2]. Other selection criteria, such as immunomodulatory properties, the ability to strengthen the gut barrier and to lower the level of stress hormones can also be considered. The use of personalized psychobiotics in the future is also possible. Screening should begin in vitro, then in vivo, after which the selected strains are tested in humans. In 2016, the first psychobiotic Probio'Stick® was released in Canada for use in stress-related disorders.

In the laboratory of genetics of microorganisms, Vavilov Institute of General genetics, Russian Academy of Sciences, we carried out a multistage selection process among Lactobacilli and Bifidobacteria isolated from the gut of healthy people, residents of the central region of the Russian. At the first stage, strains were selected for their ability to synthesize GABA from its predecessor monosodium glutamate [3]. GABA production as well as the presence of genes necessary for its synthesis and their expression were studied in this work. Selected strains were also characterized by antioxidant activity. The DNA of the selected strains was sequenced and analyzed for the presence of "probiotic genes" related to the synthesis of SCFAs, immunomodulating



properties, etc. Based on the screening, two strains of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium adolescentis* were selected, which served as the basis for the development of the psychobiotic. The antidepressant effect of the drug was confirmed in the Porsolt swim test performed on Balb/c mice. Experiments on Sprague-Dawley rats suggest that the effect of the drug is related to its ability to reduce the level of prolactin in blood plasma. The developed drug will undergo preclinical studies, and will be registered as a biologically active additive.

*References:*

- 1-Shanahan F, Dinan T.G., Ross P, Hill C., *Probiotics in transition//Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012. Vol. 10. №11. P. 1220-4.
- 2-Yunes R.A., Poluektova E.U., Dyachkova M.S., Klimina K.M., Kovtun A.S., Averina O.V., Orlova, V.S., Danilenko V.N., *GABA production and structure of gadB/gadC genes in Lactobacillus and Bifidobacterium strains from human microbiota//Anaerobe.* 2016. Vol. 42. 197-204.

УДК: 573.4

## СИСТЕМЫ ТОКСИН-АНТИТОКСИН II ТИПА КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ МАРКЕР ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОСТАВА МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА

**К.М.Климина, Е.У.Полуэктова, М.В.Одорская, В.Н.Даниленко**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Россия, 119991, Москва, Губкина, 3, , +74991351239

Создана база данных по генам ТА систем II типа для наиболее распространенных бактерий кишечника. Разработана программа ТАГМА на основе созданной базы данных для анализа метагеномов. Показано, что ТАГМА может быть использована для идентификации видов и штаммов (группы штаммов) бактерий желудочно-кишечного тракта в метагеномах по комбинации ТА систем.

**Ключевые слова:** системы токсин-антитоксин, молекулярные маркеры, метагеномы, микроорганизмы, бактерии, метагеномный анализ

Желудочно-кишечный тракт человека включает в себя широкий спектр бактерий, влияющих на метаболизм, иммунный статус и нервную систему организма хозяина. Обычно анализ микробиоты осуществляется преимущественно на уровне крупных таксонов, реже – видов. Однако разнообразие бактерий не ограничивается видами; штаммы бактерий могут значительно отличаться друг от друга по свойствам, характеру метаболизма и коррелировать с различными заболеваниями. Характеристика штаммового разнообразия микробиоты разработана крайне недостаточно. Кроме того, многие симбиотические бактерии, обитающие в микробиоте кишечника, например, лактобациллы и бифидобактерии, составляют всего лишь небольшую часть (0,5 и до 10% соответственно), поэтому существующими методами трудно охарактеризовать видовое разнообразие этих бактерий в метагеноме. Поэтому существует потребность в поиске функциональных маркеров видового и штаммового разнообразия, присутствующих у большинства бактерий микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Подобный анализ метагеномов важен для персонализированной медицины, для диагностики и лечения различных патологий или пограничных состояний.

Ранее нами было показано наличие систем токсин-антитоксин (ТА) II типа суперсемейств MazEF and RelBE в пробиотических бактериях рода *Bifidobacterium* и рода *Lactobacillus*, а также возможность использовать комбинацию генов ТА систем для видовой и штаммовой идентификации этих бактерий. Затем нами был проведен расширенный поиск ТА систем и составлен общий каталог по основным ТА системам, с идентифицированными доменами для наиболее распространенных бактерий кишечника. Созданная база данных по генам ТА систем включает 4239 нуклеотидных последовательностей, которые представлены 50-ми родами и 489 различными видами бактерий ЖКТ. Из базы данных исключались гены, которые локализованы на плаزمиде, что уменьшало вероятность неверно определенных видов в результате таксономического анализа. Анализ аминокислотных последовательностей ТА систем с помощью CLANS показал высокую идентичность белков внутри семейства. ТА систем с одинаковым доменом объединились в кластеры.

Была разработана программа ТАГМА для анализа метагеномов, в основу которой лег каталог по основным ТА системам. Созданная база данных использовалась для валидации программы ТАГМА на 9-ти симулированных метагеномах. ТАГМА по сравнению с существующими методами метагеномного анализа

(MetaPhlan, PhymmBL) при анализе на уровне видов была сравнима с MetaPhlan2 но оказалась несколько менее чувствительна, чем PhymmBL. TAGMA для анализа использует небольшой набор генов (от 2 до 10) для определения видов в метагеномах, в то время как другие программы используют несколько десятков генов (до 1 млн.). Разработанная нами программа TAGMA является гораздо более быстрой в использовании и для анализа одного метагенома требуется несколько часов, а анализ с помощью таких программ как MetaPhlan2 и PhymmBL может занять несколько дней.

**Финансирование:** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00011

UDC 573.4

## TYPE II TOXIN-ANTITOXIN SYSTEMS AS FUNCTIONAL MARKERS FOR METAGENOMIC STUDIES

**K.Klimina, E.Poluektova, M.Odorskaya, V.Danilenko**

*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, Россия, 119991, Moscow, Gubkin str., 3*

Database and TAGMA software for metagenomes analysis based on TA systems type II for the most common bacteria from human gastrointestinal tract were created. TAGMA can be used to identify the species and strains (group of strains) of bacteria in metagenomes based on the combination of TA systems.

**Key words:** toxin-antitoxin systems, molecular markers, metagenomes, microorganisms, bacteria, metagenomic analysis

The human gastrointestinal tract (GT) includes a wide variety of bacteria affecting to metabolism of all biological systems of the host organism. The particular effect of the gut microbiota (GM) depends on its composition not just at the species level but also at the strain level. Recently it has been reported that the presence of particular strains of the same species correlates with various human diseases. Methods for strain characterization in microbiota are still not adequate. Probiotic bacteria of the genus *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* make an essential component of GM and constitute a small part of human GM (0,5 и 10%) therefore, existing methods were not able to identify these genus adequately. Identification of novel functional markers highly represented in most human GM samples is actual task. Analysis of metagenomes is important for personalized medicine, for diagnosis and treatment of various pathologies or borderline conditions.

Previously we have shown that in *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* sp. the TA systems may be used as functional biomarkers to differentiate these groups of bacteria at the species and strain levels. We expanded the database of TA systems and included bacteria inhabiting the GM. The created database includes 4239 nucleotide sequences, which are represented by 50 genera and 489 different species of bacteria. Genes localized on plasmids were excluded from the database. It is reduced the incorrectly defined species as a result of taxonomic analysis. CLANS showed a high identity of proteins within TA systems. TA systems with the same domain joined into clusters.

The TAGMA software for metagenomes analyses based on the TA systems have been developed and tested on 9 simulated metagenomic samples. TAGMA was compared with existing methods of metagenomic analysis (MetaPhlan, PhymmBL), and at the species level outperformed MetaPhlan2 but proved to be somewhat less sensitive than PhymmBL. TAGMA used a small set of genes (from 2 to 10) to determine species in metagenomes, whereas other programs use a few dozen of genes (up to 1 million). Based on a limited number of well selected markers TAGMA displays good time performance taking several hours to analyze a single metagenome as compared with several days required for MetaPhlan2 or PhymmBL.

**Grant:** The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-00011

УДК 579.222; 615.313

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ЖКТ ЧЕЛОВЕКА: ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ НЕИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Даниленко В.Н.

Федеральное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия  
 119333 Москва, ул. Губкина, д. 3  
 e-mail: valerid@vigg.ru

В докладе обсуждается роль ключевых компонентов микробиоты ЖКТ человека во взаимодействии с центральной и периферической нервными системами, определяются параметры, характеризующие ее в норме и патологиях, и предлагаются подходы для коррекции микробиоты при ее дисфункциях.

**Ключевые слова:** микробиота, микробиом, метагеномный анализ, нейромодуляторы, коррекция микробиоты.

Сегодня микробиоту кишечника (ЖКТ) человека представляют как отдельный орган, осуществляющий через пищевые ингредиенты интеграцию взаимодействия центральной нервной системы (ЦНС) с факторами внешней среды и другими органами и системами. Взаимодействие ЖКТ с ЦНС может осуществляться напрямую через блуждающий нерв, а также через периферическую нервную и иммунную системы. Выявление новых механизмов взаимодействия ЖКТ и ЦНС позволяет по-другому оценивать ограничивающую роль гематоэнцефалического барьера в этой коммуникации. Взаимодействие ЖКТ и ЦНС является двунаправленным и описывается термином ось микробиота – кишечник – мозг. Важнейшим свойством ЖКТ является способность бактерий ее составляющих продуцировать метаболиты с потенциальной нейромодулирующей активностью.

В первую очередь это относится к нейротрансмиттерам и их предшественникам: ГАМК, дофамину, серотонину, гистамину, короткоцепочным жирным кислотам и т.д. Помимо веществ с нейромодулирующей активностью бактерии ЖКТ продуцируют вещества с иммуномодулирующей и антиоксидативной активностью. Большая часть бактерий ЖКТ относится к 6 типам и более чем 50 родам. Считается, что таксономический состав («коровый») взрослого здорового индивидуума является относительно стабильным на протяжении его жизни.

В наших исследованиях мы попытались выявить параметры, характеризующие состояние микробиоты ЖКТ в норме [1]. По результатам анализа метагеномных данных микробиоты ЖКТ здоровых людей мы предложили для ее характеристики сигнатуру, представленную комбинацией двух параметров: наиболее часто встречаемые роды бактерий (8), содержащие наиболее часто встречаемые гены, кодирующие продукты с нейромодулирующей активностью. Исследования последних лет показывают, что практически все заболевания человека – гастроэнтерологические, иммунобиологические, кардиологические, нейродегенеративные – сопровождаются изменениями «корового» состава микробиоты [2]. Иногда это может быть первопричиной различных заболеваний. Встает вопрос: можем ли мы, корректируя тем или иным способом микробиом (микробиоту) ЖКТ, восстановить или в определенной степени нормализовать функционирование его других органов. Такие подходы разрабатываются, в том числе и в нашей лаборатории, они включают применение пробиотиков нового поколения: психобиотиков, иммунобиотиков, антиоксидантных биотиков [3, 4]; использование антибиотиков и их более мягких форм ингибиторов бактериальных протеинкиназ [5]; трансплантация «коровой» части микробиоты и др. А самое главное, к «новому» эндокринному органу (микробиоте) мы должны относиться так же, как и к другим нашим органам, в том числе при создании и применении лекарственных препаратов, учитывая их побочное действие на него.

### Литература:

1. Ковтун А.С. и др. *In silico* определение метагеномной сигнатуры, отражающей нейрометаболический потенциал микробиоты кишечника человека в норме // *Генетика*. – 2018. – Т. 54, № 9.
2. Аверина О.В., Даниленко В.Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // *Микробиология*. – 2017. – Т. 86, №1. – С. 5-24.
3. Yunes R.A. et al. GABA production and structure of *gadB/gadC* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota//*Anaerobe*. 2016. №42. P. 197-204.
4. Marsova M. et al. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of *Lactobacillus* strains from human microbiota//*World J Microbiol Biotechnol*. 2018. Vol. 34. №2. 27.
5. Захаревич Н.В. и др. Серин-треониновые протеинкиназы бактерий – потенциальная мишень для регуляции состава микробиоты человека // *Вестник РГМУ*. – 2017. – №2. – С. 20-29.

UDC 579.222; 615.313

## FUNCTIONAL METAGENOMIC ANALYSIS OF THE HUMAN GUT MICROBIOTA: POTENTIAL FOR PERSONALIZED TREATMENT OF NON-INFECTIOUS DISEASES

Danilenko V.N.

Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
119333 Moscow, Gubkina, 3  
e-mail: valerid@vigg.ru

In this report, the role of key components of the human gastrointestinal microbiota in interaction with the central and peripheral nervous systems is discussed. The parameters that characterize the gut microbiota in the norm and pathology are defined. Approaches for correcting a dysbiotic gut microbiota are suggested.

**Key words:** microbiota, microbiome, metagenomic analysis, neuromodulators, microbiota correction.

Today, the intestinal microbiota (GIT) is considered a separate organ, which through food ingredients, integrates the interaction of the central nervous system (CNS) with environmental factors and other organs and systems. The interaction of the gastrointestinal tract with the central nervous system can be mediated directly through the vagus nerve or through the peripheral nervous system and immune system. The discovery of new mechanisms of interaction between the gastrointestinal tract and the central nervous system made it possible to reevaluate the limiting role of the blood-brain barrier in this communication. The interaction of the gastrointestinal tract and the central nervous system is bi-directional and is described by the term gut-brain-axis. The most important property of the gastrointestinal tract is its ability to produce metabolites with potential neuromodulatory activity.

This primarily applies to neurotransmitters and their precursors: GABA, dopamine, serotonin, histamine, short-chain fatty acids, etc. In addition to substances with neuromodulatory activity, GIT bacteria produce substances with immunomodulating and antioxidative activity. Most of the bacteria in the GIT can be subdivided into 6 types and more than 50 genera. It is believed that the taxonomic composition of the core gut microbiome is relatively stable throughout a person's life.

In our research, we tried to identify the parameters characterizing the state of the gastrointestinal microbiota in the norm [1]. By analyzing the metagenomic data of the gut of healthy people, we proposed for its characterization a signature represented by a combination of two parameters: the most common genera of bacteria (8) containing the most frequently encountered genes encoding products with neuromodulatory activity. Recent studies show that virtually all human diseases - gastroenterological, immunobiological, cardiac, neurodegenerative - are accompanied by changes in the core composition of the microbiota [2]. In some cases, changes in the gut microbiome composition can be the root cause of certain diseases. The question that arises is: can we, by correcting in one way or another, a dysbiotic gut microbiota, restore or to some extent normalize the functioning of its other organs. Such approaches are being developed, including our laboratory; they include the use of new-generation probiotics: psychobiotics, immunobiotics, antibioiotics [3, 4]; the use of antibiotics and their milder forms of inhibitors of bacterial protein kinases [5]; transplantation of the core microbiota etc. And most importantly, we should take care of our gut microbiota the same way we take care of other organs, including testing the side effects of drugs on its composition.

### References:

1. A. Kovtun. et al. *In silico* definition of the metagenomic signature reflecting the neurometabolic potential of the human intestinal microbiota in the norm // *Genetika*. - 2018. - T. 54, № 9.
2. Averina O.V., Danilenko V.N. Microbiota of the human intestine: a role in the development and functioning of the nervous system // *Microbiology*. - 2017. - T. 86, №1. - P. 5-24.
3. Yunes R.A. et al. GABA production and structure of *gadB* / *gadC* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota // *Anaerobe*. 2016. №42. R. 197-204.
4. Marsova M. et al. A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of *lactobacillus* strains from human microbiota // *World J Microbiol Biotechnol*. 2018. Vol. 34. № 2. 27.
5. Zakharevich N.V. Serine-threonine protein kinases of bacteria - a potential target for the regulation of human microbiota composition // *Vestnik RSMU*. - 2017. - №2. - P. 20-29.

## ОМИКСНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ. ЛЕЧЕНИЕ С ПОЗИЦИЙ БИОИНФОРМАТИКИ, МОЛЕКУЛЯРНОЙ КЛЕТочНОЙ БИОЛОГИИ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

### USING OMIC TECHNOLOGIES IN CLINICAL ONCOLOGY. TREATMENT IN TERMS OF BIOINFORMATICS, MOLECULAR /CELLULAR BIOLOGY AND CLINICAL MEDICINE

1. ИЗМЕНЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ АДРЕСНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ MINISOG ПРИ ИХ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ С РЕЦЕПТОРОМ-МИШЕНЬЮ, Кузичкина Е.О., Шилова О.Н., Деев С.М. ....	355
CHANGE OF TOXIC AND FLUORESCENT PROPERTIES OF TARGETED PHOTSENSITIZERS BASED ON MINISOG IN THEIR INTERNALIZATION WITH THE TARGET RECEPTOR, Kuzichkina E.O., Shilova O.N., Deyev S.M. ....	356
2. МОДИФИКАЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА TRAIL DR5-B ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ, Ф.В.Журавлева, А.В.Яголович, М.Э.Гаспарян .....	357
MODIFICATION OF ANTITUMOR CYTOKINE TRAIL DR5-B FOR FUNCTIONAL STUDIES, F.Zhuravleva, A.Yagolovich, M.Gasparian .....	358
3. НОВАЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ИММУНОТРОПНЫХ СРЕДСТВ, Подлесных С. В., Шаньшин Д. ВД., Колосова Е. А., Мурашкин Д. Е., Шапрова О. Н., Щербаков Д. Н., Шойхет Я.Н., Лазарев А.Ф., Шаповал А. И. ....	359
NEW RESEARCH PLATFORM FOR IMMUNODIAGNOSTIC AND IMMUNOTHERAPEUTIC TOOLS DEVELOPMENT, Podlesnykh S.V., Shanshin D.V., Kolosova E.A., Murashkin D.E., Shaprova O.N., Shcherbakov D. N., Shoikhet Y.N., Lazarev A.F., Chapoval A.I. ....	360
4. ПЕПТИДЫ-АНТАГОНИСТЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ КОНТРОЛЬНЫМИ ТОЧКАМИ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, С.В.Подлесных, Д.В.Шаньшин, Е.А.Колосова, Д.Е.Мурашкин, О.Н.Шапрова, Д.Н.Щербаков, А.И.Шаповал .....	361
PEPTIDES-ANTAGONISTS INTERACTING WITH IMMUNE CHECKPOINTS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY, S.Podlesnykh, D.Shanshin, E.Kolosova, D.Murashkin, O.Shaprova, D.Shcherbakov, A.Chapoval .....	362
5. ПЕРСОНАЛЬНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ТРУДНО ДИАГНОСТИРУЕМЫХ ФОРМАХ РАКА, Пономарев А.В. ....	363
PERSONALIZED MOLECULAR PROFILING IN HIGH-RISK CANCERS, Ponomarev A.V. ....	364
6. ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ, Шаронов Г.В., Барбашова Л.Н., Южакова Д.В., Жигалова Е.А., Клементьева Н.В., Чудаков Д.М. ....	365
THE WAYS TO INCREASE IMMUNOTHERAPY EFFICACY ON THE BASIS OF TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES, Sharonov G.V., Barbashova L.N., Yuzhakova D.V., Zhigalova E.A. Klementeva N.V., Chudakov D.M. ....	366
7. РОЛЬ ГЕНА IGFBP6 В ИНВАЗИИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, Никулин С.В., Захарова Г.С., Полозников А.А., Алексеев Б.Я. ....	366
ROLE OF IGFBP6 GENE IN INVASION OF BREAST CANCER CELLS, Nikulin S.V., Zakharova G.S., Poloznikov A.A, Alekseev B.Ya. ....	367
8. ЦИКЛИЧЕСКИЕ РНК: ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ, Филиппенков И.Б., Ставчанский В.В., Денисова А.Е., Лимборская С.А., Дергунова Л.В. ....	368
CIRCULAR RNA: PECULIARITIES OF EXPRESSION IN THE NORM AND IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA, Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Denisova A.D., Limborska S.A., Dergunova L.V. ....	370

УДК 577.29

## ИЗМЕНЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ АДРЕСНЫХ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА ОСНОВЕ miniSOG ПРИ ИХ ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ С РЕЦЕПТОРОМ-МИШЕНЬЮ

Кузичкина Е.О., Шилова О.Н., Деев С.М.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия  
E-mail: kuzichkinazhenya@mail.ru

Наличие флуоресцентных свойств у токсического модуля miniSOG в составе рекомбинантных белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG может быть использовано для изучения динамики интернализации рецептора HER2. Было показано, что основной причиной снижения интенсивности флуоресценции фототоксинов на основе miniSOG является их экранирование и поглощение флуоресценции miniSOG флуорофорами клетки.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, флавопротеид miniSOG, рецептор HER2, интернализация.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) используется в лечении онкологических заболеваний как метод локального воздействия на опухоль за счет активации доставленного в опухоль фотосенсибилизатора. В настоящее время большое внимание уделяется разработке новых терапевтических агентов для адресной доставки к опухолевым клеткам. Рекомбинантные фототоксины DARPIn-miniSOG [1] и 4D5scFv-miniSOG [2] были ранее сконструированы в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН. Эти генетически кодируемые фотосенсибилизаторы состоят из адресных модулей – белка неиммуноглобулиновой природы DARPIn и одноцепочечного варианта моноклонального антитела IgG1 4D5scFv, а также токсического модуля – зеленого флуоресцентного флавопротеина miniSOG. В качестве мишени для доставки агентов использовался онкомаркер HER2, гиперэкспрессия которого характерна для многих типов опухолей.

Были наработаны и очищены генетически кодируемые белки DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG. Высокая специфичность их связывания с поверхностным клеточным рецептором HER2 была подтверждена с помощью метода проточной цитофлуориметрии на HER2-положительных клетках аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3. Целевые белки способны оказывать специфическое цитотоксическое действие на клетки линии SK-BR-3 за счет их активации при облучении синим светом с последующей генерацией активных форм кислорода. Стоит отметить, что DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG имеют близкие по значению константы связывания, но при этом проявляют разные цитотоксические эффекты. Было продемонстрировано, что разность в цитотоксичности этих белков объясняется разной скоростью протекания лиганд-индуцированной интернализации комплекса рецептор-белок. Показано, что при температуре +37°C рекомбинантный белок DARPIn-miniSOG интернализуется быстрее, чем 4D5scFv-miniSOG, в связи с чем 4D5scFv-miniSOG проявляет более высокую цитотоксичность. В данном случае динамику интернализации удобно детектировать напрямую, используя метод проточной цитофлуориметрии, за счет флуоресцентных свойств модуля miniSOG. В условиях протекания интернализации падение флуоресцентного сигнала DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG происходило с разной скоростью.

Для выяснения причин снижения токсичности miniSOG при его интернализации был изучен механизм его гашения в эндосоме. Было показано, что снижение интенсивности флуоресцентного сигнала miniSOG может быть связано с экранированием молекулы белка и поглощением ее флуоресценции хромофорами клетки. Возможность поглощения флуоресценции miniSOG была подтверждена на примере химического красителя трипанового синего, способствующего полному гашению флуоресцентного сигнала DARPIn-miniSOG. Нативными перехватчиками излучения miniSOG внутри клетки могут выступать цитохромы, в том числе цитохром с. Было показано, что при возбуждении флуоресценции в присутствии цитохрома как флавинмононуклеотид, так и DARPIn-miniSOG демонстрируют падение флуоресцентного сигнала в 2 раза, при этом DARPIn, конъюгированный с FITC, стандартным флуоресцентным красителем, не показал такого результата. Кроме того, результаты показали, что падение флуоресценции белков не зависит от pH в пределах значений, достижимых внутри клетки, а также от воздействия на белки эндосомальных протеаз и восстановления кофактора.

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-24-00106.

Литература:

1. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Biochimie*. 2015. V. 118. P. 116-122.
2. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics*. 2013. V. 3. № 11. P. 831-840.

УДК 577.29

## CHANGE OF TOXIC AND FLUORESCENT PROPERTIES OF TARGETED PHOTSENSITIZERS BASED ON MINISOG IN THEIR INTERNALIZATION WITH THE TARGET RECEPTOR

Kuzichkina E.O., Shilova O.N., Deyev S.M.

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*  
 E-mail: kuzichkinazhenya@mail.ru

Fluorescent properties of the toxic module miniSOG as a part of recombinant HER2-targeted proteins DARPin-miniSOG and 4D5scFv-miniSOG can be used to study the dynamics of the HER2 receptor internalization. It was shown that the main reason for the decrease of fluorescence intensity of phototoxins based on miniSOG is its shielding and absorption of the miniSOG fluorescence by the inner cell fluorophores.

Keywords: photodynamic therapy, flavoprotein miniSOG, HER2 receptor, internalization.

Photodynamic therapy (PDT) is used in the treatment of cancer as a method of local influence on the tumor by activating the photosensitizer delivered to the tumor. Nowadays much attention is paid to the development of new therapeutic agents for targeted delivery to tumor cells. Recombinant phototoxins DARPin-miniSOG [1] and 4D5scFv-miniSOG [2] were previously constructed in the Laboratory of Molecular Immunology of the IBCh RAS. These genetically encoded photosensitizers consist of address modules - a non-immunoglobulin protein DARPin and a single-chain variant of monoclonal antibody IgG1 4D5scFv, as well as the toxic module - a green fluorescent flavoprotein miniSOG. The tumor marker HER2 was used as a target for delivery of the agents. The overexpression of this receptor is observed in many types of tumors.

The genetically encoded proteins DARPin-miniSOG and 4D5scFv-miniSOG were produced in *E. coli* and further purified. The high specificity of their binding to the surface cellular receptor HER2 was confirmed by flow cytometry on HER2-positive breast adenocarcinoma cells SK-BR-3. The target proteins have shown a specific cytotoxic effect on the SK-BR-3 cells in case of their activation by blue light irradiation that leads to generation of reactive oxygen species. It should be noted that DARPin-miniSOG and 4D5scFv-miniSOG have comparable binding constants, but they exhibit different cytotoxic effects. It was demonstrated that the difference in the cytotoxicity of these proteins is explained by the different rates of ligand-induced internalization of the receptor-protein complex. It is shown that at +37°C temperature the recombinant protein DARPin-miniSOG is internalized faster than 4D5scFv-miniSOG, and therefore 4D5scFv-miniSOG exhibits the higher cytotoxicity. In this case, the dynamics of internalization can be detected directly using flow cytometry due to fluorescence properties of the miniSOG module. During internalization, the fluorescent signals DARPin-miniSOG and 4D5scFv-miniSOG were decreasing with different rates.

It was shown that the decrease in the intensity of the fluorescent signal of miniSOG can be associated with the shielding of the protein molecule and the absorption of its fluorescence by the chromophores of the cells. The possibility of absorbing the fluorescence of miniSOG was confirmed using the chemical dye trypan blue, which contributes to the complete suppression of the fluorescent signal of DARPin-miniSOG. Native interceptors of miniSOG emission inside the cell can be the cytochromes, including the cytochrome c. It was shown that in the presence of cytochrome c fluorescence of both flavin mononucleotide and DARPin-miniSOG decreased 2-fold, while DARPin conjugated with FITC, a standard fluorescent dye, did not show such result. In addition, the results demonstrate that the decrease in fluorescence of the proteins is not affected by pH in range that is achievable within the cell, as well as by digestion of proteins by endosomal proteases and cofactor reduction.

This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 14-24-00106).

### References:

1. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Biochimie*. 2015. V. 118. P. 116-122.
2. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics*. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.

УДК: 577.2, ББК: 28.04

## МОДИФИКАЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА TRAIL DR5-B ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Ф.В.Журавлева, А.В.Яголович, М.Э.Гаспарян**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), Москва, Россия, Российская Федерация, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, faina.juravleva@yandex.ru, 89266295550

Был получен мутантный вариант противоопухолевого цитокина TRAIL DR5-B и конъюгирован с флуоресцентной меткой сульфо-Су3-малеимидом по аминокислотному остатку цистеина. Полученный белок DR5-B/V114C-Су3 проявил аналогичную DR5-B цитотоксичность на линии опухолевых клеток НСТ116, а при связывании с рецептором DR5 интернализировался и накапливался внутри клеток.

**Ключевые слова:** рецептор-селективный цитокин TRAIL DR5-B, флуорофор, сульфо-Суаніне3-малеимид, рецептор смерти DR5, интернализация рецептора

Ранее был создан рецептор-селективный вариант TRAIL DR5-B, который селективно связывается с рецептором смерти DR5, не проявляя аффинности к другим рецепторам цитокина (DR4, DcR1, DcR2, OPG). Также было показано, что DR5-B в 2-5 раза эффективнее уничтожает опухолевые клетки по сравнению с TRAIL дикого типа [1]. Целью данной работы было получение модифицированного варианта цитокина для дальнейших функциональных исследований.

Был получен мутантный вариант TRAIL DR5-B V114C путем сайт-специфического мутагенеза. Белок DR5-B/V114C был наработан в клетках E. coli. Очистка проводилась на аффинном сорбенте Ni-NTA с последующей доочисткой на сорбенте SP Sepharose. Далее очищенный белок DR5-B/V114C был конъюгирован с флуорофором сульфо-суаніне3-малеимидом путем инкубации в мольном отношении 1:20 при pH 7-7.5 при комнатной температуре в течение 16 часов. Несвязавшуюся метку отделяли с помощью гель-фильтрации на колонке Illustra NAP-10. Белок DR5-B/V114C-Су3 проявил аналогичную DR5-B цитотоксичность на линии опухолевых клеток НСТ116. Интернализация DR5-B/V114C-Су3 наблюдалась методом флуоресцентной микроскопии в линии клеток НТ29. Было показано, что белок DR5-B/V114C-Су3 при связывании с рецептором DR5 быстро интернализируется и накапливается внутри клеток.

Полученный мутантный вариант TRAIL DR5-B с мутацией V114C на N-конце полипептидной цепи позволяет ковалентно конъюгировать белок по аминокислотному остатку цистеина с maleimide группами различных соединений для функциональных исследований белка, в частности, с флуорофорами, стабилизаторами структуры белка на основе ПЭГ, а также с различными наночастицами и липосомами. Флуоресцентно-меченый белок DR5-B/V114C-Су3 является инструментом для исследования лиганд-опосредованной интернализации рецептора смерти DR5 при активации сигнального пути апоптоза.

### Литература:

1. Гаспарян М.Э., Бычков М.Л., Яголович А.В., Долгих Д.А. и др. Мутации, повышающие селективность противоопухолевого цитокина TRAIL к рецептору DR5, усиливают его цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам // Биохимия. 2015. №80. С.1080–1091.

**Финансирование:** Работа поддержана грантом РФФИ № 18-34-00812.



UDC 577.2, BBC 28.04

## MODIFICATION OF ANTITUMOR CYTOKINE TRAIL DR5-B FOR FUNCTIONAL STUDIES

**F.Zhuravleva, A.Yagolovich, M.Gasparian**

*Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of sciences, Moscow, Russia, Russian Federation, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya, 16/10*

TRAIL DR5-B/V114C-Cy3 mutant variant was obtained and conjugated with a fluorescent label sulfo-Cy3-maleimide by the cysteine amino acid residue. The resulting fluorescent-labeled protein DR5-B/V114C-Cy3 showed similar cytotoxicity to DR5-B in tumor cell line HCT116 and was rapidly internalized and accumulated inside the cells after binding to the DR5 receptor.

**Key words:** receptor-selective cytokine TRAIL DR5-B, fluorophore, sulfo-Cyanine3-maleimide, DR5 receptor, receptor internalization

Previously we created a receptor-selective variant TRAIL DR5-B, which selectively binds only to death receptor DR5 without affinity for other TRAIL receptors (DR4, DcR1, DcR2, OPG). We also showed that DR5-B 2-5 times more effectively destroys tumor cells compared to wild type TRAIL [1]. The aim of this work was to obtain a modified version of the cytokine for further functional studies.

TRAIL mutant variant DR5-B/V114C was obtained by site-specific mutagenesis. The TRAIL DR5-B/V114C protein was produced in *E. coli* cells and purified on the affinity sorbent Ni-NTA, followed by cation-exchange sorbent SP Sepharose. Further, the purified protein DR5-B/V114C was conjugated to the sulfo-cyanine3-maleimide fluorophore by incubating at molar ratio 1:20 and pH 7-7.5 at room temperature for 16 hours. The unbound label was separated by gel filtration on the Illustra NAP-10 column. Protein DR5-B/V114C-Cy3 showed cytotoxicity in the tumor cell line HCT116 similar to DR5-B. The internalization of DR5-B/V114C-Cy3 was observed by fluorescence microscopy in HT29 cell line. DR5-B/V114C-Cy3 protein rapidly internalizes and accumulates inside the cells after binding to the DR5 receptor.

The obtained TRAIL mutant variant DR5-B with substitution V114C at the N-terminus of the polypeptide chain allows to covalently conjugate the protein by cysteine residue with maleimide groups of various compounds, in particular, with fluorophores, PEG-based protein structure stabilizers, various nanoparticles and liposomes for functional studies. The fluorescently-labeled protein DR5-B/V114C-Cy3 is a tool for studying of ligand-mediated DR5 receptor internalization upon activation of the apoptotic signaling pathway.

### References:

1. Gasparian, M. E., Bychkov, M. L., Yagolovich, A. V., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P. (2015). Mutations enhancing selectivity of antitumor cytokine TRAIL to DR5 receptor increase its cytotoxicity against tumor cells. *Biochemistry (Moscow)* 80(8): 1080-1091.

**Grant:** The work is supported by the RFBR grant No. 18-34-00812.

УДК 571.27

## НОВАЯ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ИММУНОТРОПНЫХ СРЕДСТВ

Подлесных С. В.<sup>1</sup>, Шаньшин Д. В.<sup>2</sup>, Колосова Е. А.<sup>1,2</sup>, Мурашкин Д. Е.<sup>1,2</sup>, Шапрова О. Н.<sup>2</sup>, Щербаков Д. Н.<sup>1,2</sup>, Шойхет Я.Н.<sup>3</sup>, Лазарев А.Ф.<sup>4</sup>, Шаповал А. И.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Российско-Американский противораковый центр, Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, Россия.

<sup>2</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия, 630559, Кольцово, Россия

<sup>3</sup> Алтайский государственный медицинский университет, 656038, Барнаул, Россия.

<sup>4</sup> Алтайский филиал Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н. Н. Блохина, 656045, Барнаул, Россия.

<sup>5</sup> Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна, Университет штата Аризона, 85287, Темпи, Аризона, США

e-mail: andreichapoval@gmail.com

Обсуждается новая платформа, на основе пептидных микрочипов, которая позволяет анализировать образцы крови на присутствие одновременно сотен, тысяч антител для диагностики различных заболеваний. Эти микрочипы могут быть также использованы для выявления пептидов, комплементарно взаимодействующих с различными молекулами, что позволяет определить мишени для создания новых терапевтических пептидов.

**Ключевые слова:** пептидные микрочипы; антитела; биомаркеры; иммунодиагностика; ингибиторные иммунные контрольные точки; иммунотерапия.

Современные биомедицинские исследования значительно изменились после разработки постгеномных технологий, таких как секвенирование нового поколения и микрочипы, которые могут быть использованы, как для диагностических, так и для исследовательских целей. Микрочипы представляют собой эффективный и высокопроизводительный инструмент для исследования генома и протеома. Пептидные микрочипы могут быть использованы для различных исследований, включая профилирование репертуара циркулирующих антител (изучение иммуносигнатур при онкологических, инфекционных, аутоиммунных, нейродегенеративных и аллергических заболеваниях), а также оценки белок-белковых взаимодействий.

В данном исследовании использованы микрочипы, содержащие сотни тысяч пептидов, со случайными аминокислотными последовательностями, для изучения репертуара антител в плазме крови пациентов с онкологическими и другими заболеваниями. Наши исследования показали, что в крови пациентов с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) содержатся антитела комплементарные определенным пептидам, представленных на микрочипах. Панели пептидов, специфически взаимодействующих с сывороткой пациентов, могут служить основой для создания диагностических тест-систем для определения заболеваний. В тоже время, микрочипы, содержащие тысячи пептидов, могут быть использованы для скрининга групп риска различных заболеваний и «молекулярной диспансеризации» населения. Возможность одновременной идентификации различных заболеваний, с помощью анализа репертуара циркулирующих антител (биомаркер), делает технологию пептидных микрочипов одной из самых перспективных и востребованных для совершенствования иммунодиагностики.

Блокада белок-белковых взаимодействий между CTLA-4 и B7-1/B7-2, а также PD-1 и его лигандом B7-H1 (PD-L1), демонстрирует большие перспективы для высокоэффективного лечения рака. С помощью микрочипов, описанных выше, и рекомбинантных химерных белков, содержащих Fc-фрагменты IgG (CTLA-4Fc и PD-1Fc), мы выявили пептиды, которые специфически взаимодействуют с CTLA-4 и PD-1. Метод 3D моделирования позволил определить пептиды, гомологичные пространственной структуре связывающего центр лиганда B7-1, взаимодействующего с MYPPPYU петлей CTLA-4 рецептора. Используя такую стратегию можно быстро и эффективно выявлять пептиды взаимодействующие и блокирующие другие, недавно открытые иммунорегуляторные молекулы, такие как B7-H3, B7-H4, VISTA, B7-H6, HHLA2, etc. Мы предполагаем, что пептиды, взаимодействующие с ингибиторными иммунными контрольными точками, могут быть более эффективными, по сравнению с моноклональными антителами, для стимуляции противоопухолевого иммунного ответа без побочных эффектов. Также пептиды, выявленные с помощью микрочипов, помогут ответить на фундаментальный вопрос иммунологии, для чего существует такое количество «костимуляторных» молекул, и есть ли у них уникальные функции.

Таким образом, пептидные микрочипы могут быть использованы для создания мощного, нового инструмента для изучения репертуара циркулирующих антител в норме и патологии, а также исследования и оценки белок-белковых взаимодействий для поиска новых лекарств.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проекты № 17-04-00321\17 и 17-54-33003\17) и государственного задания Минобрнауки России (№6.3892.2017/4.6.).

UDC 571.27

## NEW RESEARCH PLATFORM FOR IMMUNODIAGNOSTIC AND IMMUNOTHERAPEUTIC TOOLS DEVELOPMENT

Podlesnykh S.V. <sup>1</sup>, Shanshin D.V. <sup>2</sup>, Kolosova E.A. <sup>1,2</sup>, Murashkin D.E. <sup>1,2</sup>, Shaprova O.N. <sup>2</sup>, Shcherbakov D. N. <sup>1,2</sup>, Shoikhet Y.N. <sup>3</sup>, Lazarev A.F. <sup>4</sup>, Chapoval A.I. <sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Russian-American Anticancer Center, Altai State University, 656049, Barnaul, Russia.

<sup>2</sup> State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russia, 630559, Koltsovo, Russia

<sup>3</sup> Altai State Medical University, 656038, Barnaul, Russia.

<sup>4</sup> Altai Branch of the National Medical Research Center of Oncology N.N. Blokhina, 656045, Barnaul, Russia.

<sup>5</sup> Center for Innovations in Medicine, Biodesign Institute, Arizona State University, 85287, Tempe, Arizona, USA  
email: andreichapoval@gmail.com

We discuss a new platform based on peptide microarrays for simultaneous analysis of hundreds, thousands of antibodies in blood samples for the diagnosis of various diseases. These microarrays can also be used for the identification of peptides that interact with different molecules that helps to identify targets for new therapeutic peptides development.

**Key words:** Peptide microarray; antibodies; biomarkers; immunodiagnostics; immune checkpoints; immunotherapy.

Modern biomedical research has changed significantly since the development of postgenomic technologies, such as new generation sequencing and microarrays, which can be used for both diagnostic and research purposes. Microarrays are effective and high throughput tools for genome and proteome studies. Peptide microarrays can be used for various studies, including circulating antibodies repertoire profiling (the study of immunosignature of cancer, infectious, autoimmune, neurodegenerative and allergic diseases), as well as evaluations of protein-protein interactions.

In this study, microarrays containing hundreds of thousands of peptides with random amino acid sequences were used to study the repertoire of antibodies in blood samples from patients with cancer and other diseases. Our data indicate that circulating antibodies from patients diagnosed with breast cancer interact with certain peptides presented on microarrays. Panels of peptides specifically interacting with the sera of patients can be used for diagnostic test systems development. Microarrays containing thousands of peptides can also be used for the screening of various diseases risk groups and general population. The possibility of simultaneous identification of various diseases, by analyzing the repertoire of circulating antibodies, makes the technology of peptide microarrays one of the most promising and important for improving immunodiagnostics.

Blockade of interactions between CTLA-4 and B7-1/B7-2, as well as PD-1 and its ligand B7-H1 (PD-L1) demonstrated great promise for highly effective cancer immunotherapy. With the microarrays described above and recombinant chimeric proteins containing Fc fragments of IgG (CTLA-4Fc and PD-1Fc), we detected peptides that specifically interact with CTLA-4 and PD-1. 3D modeling determined peptides homologous to spatial structure of the binding center of B7-1 ligand interacting with the MYPPPY loop of CTLA-4 receptor. Using this strategy, it is possible to quickly and efficiently define peptides interacting and blocking other newly discovered immunoregulatory molecules, such as B7-H3, B7-H4, VISTA, B7-H6, HHLA2, etc. We suggest that peptides interacting with inhibitory immune checkpoints can be more effective compare to monoclonal antibodies for antitumor immune response stimulation without side effects. Peptides detected utilizing microarrays can also help to answer one of the fundamental question of immunology, why there are so many "costimulatory" molecules, and whether they have unique functions.

Thus peptide microarrays can be used to create new powerful tool for studying repertoire of circulating antibodies in healthy and diseased, as well as evaluating protein-protein interactions for new drugs research and development.

УДК: 571. 27 , ББК: 28.707.4

## ПЕПТИДЫ-АНТАГОНИСТЫ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С ИММУНОЛОГИЧЕСКИМИ КОНТРОЛЬНЫМИ ТОЧКАМИ ДЛЯ ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

С.В.Подлесных<sup>1</sup>, Д.В.Шаньшин<sup>2</sup>, Е.А.Колосова<sup>2</sup>, Д.Е.Мурашкин<sup>2</sup>, О.Н.Шапрова<sup>2</sup>, Д.Н.Щербаков<sup>1,2</sup>, А.И.Шаповал<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Алтайский государственный университет, Российско-американский противораковый центр, Россия, 656049, Барнаул, Ленина, 61, step-uch@mail.ru, 89236474107

<sup>2</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора России, Россия, 630559, Кольцово

<sup>3</sup> Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна, Университет штата Аризона, Россия, 656049, Барнаул, Ленина, 61

В настоящей работе приведены результаты поиска пептидов, с использованием двух технологических платформ – пептидные микрочипы и фаговый дисплей. Выявлены пептиды, взаимодействующие с молекулами, контролирующими иммунный ответ CTLA-4, PD-1, B7-1, B7-2.

**Ключевые слова:** иммунный ответ; пептидные микрочипы; фаговый дисплей; иммунологические контрольные точки; иммунотерапия.

CTLA-4, PD-1 рецепторы, экспрессируются на Т-лимфоцитах и проводят ингибирующие сигналы, которые обеспечивают супрессию иммунного ответа [1; 2]. Опухолевые клетки используют механизм взаимодействия с вышеуказанными рецепторами для уклонения от иммунологического надзора. Одним из перспективных видов иммунотерапия онкологических заболеваний, является блокирование рецепторов CTLA-4 и PD-1 с помощью моноклональных антител [3; 4]. Однако, препараты на основе антител имеют ряд ограничений, что актуализирует разработку других низкомолекулярных антагонистов, например, пептидов.

С целью выявления пептидов, взаимодействующих с CTLA-4 и PD-1 мы использовали пептидные библиотеки в формате микрочипов и фагового дисплея. Данные комбинаторные библиотеки содержат пептиды, со случайными аминокислотными последовательностями, 330 034 – для микрочипов и 3×10<sup>9</sup> – для фаговой библиотеки (Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library). Сочетание этих технологий позволяет найти пептиды, специфически взаимодействующие с одной или несколькими исследуемыми молекулами [5].

В качестве исследуемых образцов использовали рекомбинантные химерные белки, содержащие Fc-фрагмент IgG(CTLA-4Fc, PD-1Fc, B7-1Fc, B7-2Fc). С помощью описанных выше технологий были обнаружены несколько десятков пептидов, которые специфически взаимодействуют с CTLA-4 и PD-1 рецепторами, а также B7-1 и B7-2 лигандами. Используя методы 3D моделирования, определены пептиды, гомологичные пространственной структуре связывающего центр лиганда B7-1, взаимодействующего с последовательностью MYPPPYU петли рецептора CTLA-4. Выявленные, с помощью фагового дисплея и микрочипов, пептиды, взаимодействующие с CTLA-4 и PD-1, имеют общий аминокислотный мотив, что позволяет отобрать наиболее перспективные молекулы-антагонисты для экспериментальной работы *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, мы выявили пептиды, которые специфически взаимодействуют с молекулами, контролирующими иммунный ответ PD-1 и CTLA-4. Полученные пептиды, потенциально способны блокировать функциональную активность рецепторов PD-1 и CTLA-4 и могут быть использованы при разработке препаратов для иммунотерапии онкологических заболеваний.

### Литература:

1. Pardoll D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy // *Nat Rev Cancer*. 2012. Vol. 12. P. 252 – 264.
2. Buchbinder E. I., Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition // *Am J Clin Oncol*. 2016. Vol. 39. P. 98 – 106.
3. Шаповал А. И., Подлесных С. В., Колосова Е. А., Щербаков Д. Н. Новые точки контроля иммунного ответа для иммунотерапии онкологических заболеваний // *Российский онкологический журнал*. – 2017. – Т. 22. № 4. – С. 175-179.
4. Postow M. A., Callahan M. K., Wolchok J. D. Immune checkpoint blockade in cancer therapy // *J Clin Oncol*. 2015. Vol. 33. P. 1974 – 1982.
5. Подлесных С. В., Шаньшин Д. В., Колосова Е. А., Мурашкин Д. Е., Шапрова О. Н. Щербаков Д. Н., Шаповал А. И. Разработка стратегии поиска пептидных блокаторов белков в составе молекулярных точек контроля иммунного ответа // *Биоорганическая химия*. 2018. (в печати)

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 17-04-00321), государственного задания Минобрнауки России (№6.3892.2017/4.6.), «УМНИК» (№11931ГУ/2017 (от 04.07.2017)).

UDC 571. 27, BBC 28.707.4

## PEPTIDES-ANTAGONISTS INTERACTING WITH IMMUNE CHECKPOINTS FOR CANCER IMMUNOTHERAPY

S.Podlesnykh <sup>1</sup>, D.Shanshin <sup>2</sup>, E.Kolosova <sup>2</sup>, D.Murashkin <sup>2</sup>, O.Shaprova <sup>2</sup>, D.Shcherbakov <sup>1,2</sup>, A.Chapoval <sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Altai State University, Russian-American Anti-Cancer Center, Russia, 656049, Barnaul, Lenina, 61

<sup>2</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Russia, 630559, Koltsovo, -, -

<sup>3</sup> Center for Innovations in Medicine, The Biodesign Institute, Arizona State University (85287), Russia, 656049, Barnaul, Lenina, 61

Here we present the results of peptide selection using two technological platforms – peptide microarrays and phage display. Peptides interacting with molecules that control the immune response CTLA-4, PD-1, B7-1, B7-2 were identified.

**Key words:** immune response; peptide microarray; phage display; immunological checkpoints; immunotherapy.

CTLA-4 and PD-1 receptors are expressed on T lymphocytes provide inhibitory signals that result in immune response suppression [1; 2]. Tumor cells utilize this mechanism to avoid immunological surveillance. One of the promising types of cancer immunotherapy is blocking CTLA-4 and PD-1 receptors by monoclonal antibodies [3; 4]. However, antibody-based drugs have several limitations that support the development of other low-molecular antagonists, for example, peptides.

To identify peptides interacting with CTLA-4 and PD-1, we used peptide libraries in the format of microarrays and phage display. These combinatorial libraries contain peptides with random amino acid sequences, 330 034 for microarrays and  $3 \times 10^9$  for phage display (Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library). The combination of these technologies makes it possible to find peptides that interact specifically with one or more molecules of interest [5].

Recombinant fusion proteins containing the Fc fragment of IgG (CTLA-4Fc, PD-1Fc, B7-1Fc, B7-2Fc) were used as test samples. Using the techniques described above, several dozen of peptides were found that specifically interact with CTLA-4 and PD-1 receptors, as well as B7-1 and B7-2 ligands. Using 3D modeling peptides homologous to the spatial structure of the binding center of the B7-1 ligand interacting with the MYPPPY sequence of the CTLA-4 receptor loop was determined. The peptides interacting with CTLA-4 and PD-1, revealed using phage display and microarray, have common amino acid motifs, which allows selecting the most promising antagonist molecules for experimental work in vitro and in vivo.

Thus, we have identified peptides that specifically interact with molecules that control the immune response PD-1 and CTLA-4. The resulting peptides, can potentially block the functional activity of PD-1 and CTLA-4 receptors, can be used in the development of drugs for immunotherapy of cancer.

### References:

1. Pardoll D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. // *Nat Rev Cancer*. 2012. Vol. 12. P. 252 – 264.
2. Buchbinder E. I., Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition // *Am J Clin Oncol*. 2016. Vol. 39. P. 98 – 106.
3. Chapoval A. I., Podlesnykh S. V., Kolosova E. A., Shcherbakov D. N. New immunological checkpoints for cancer immunotherapy // *Russian Journal of Oncology*. 2017. Vol. 22. № 4. P. 175 – 179.
4. Postow M. A., Callahan M. K., Wolchok J. D. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. // *J Clin Oncol*. 2015. Vol. 33. P. 1974 – 1982.
5. Podlesnykh S. V., Shanshin D. V., Kolosova E. A., Murashkin D. E., Shaprova O. N., Shcherbakov D. N., Chapoval A. I. Strategies for searching peptides immune checkpoint inhibitors // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2018. (in print)

**Grant:** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project No. 17-04-00321), the state task of the Ministry of Education and Science of Russia (№6.3892.2017 / 4.6.), "UMNIK" (No. 11931U / 2017 (dd. 04.07.2017))

УДК 57.087.1:616-006

## ПЕРСОНАЛЬНОЕ МОЛЕКУЛЯРНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ТРУДНО ДИАГНОСТИРУЕМЫХ ФОРМАХ РАКА

Пономарев А.В.

Langara College, Ванкувер, Канада V5Y 2Z6, Канада, Британская Колумбия, Ванкувер, Запад 49-я авеню, д. 100  
e-mail: andrew.ponomarev@gmail.com

Молекулярное профилирование отдельного ракового генома может дать понимание об онкогенных событиях в рецидивирующих, рефрактерных или прогрессирующих раковых опухолях и опухолях, при которых диагноз не может быть поставлен с помощью стандартных молекулярных, генетических или гистологических маркеров.

**Ключевые слова:** молекулярное профилирование, трудно диагностируемые формы рака, геном рака, биоинформатика, терапевтический ответ, персональная онкогенетика.

Для эффективной борьбы с раком необходимо понимать генетические мутации, которые являются драйверами развития опухоли, делая её более агрессивной или устойчивой к терапевтическому воздействию [1]. Первичные опухоли с известным неблагоприятным прогнозом и раком с неэффективной первоначальной терапией или с низкой вероятностью излечения (рак высокого риска) являются субъектами персонализированного молекулярного профилирования [2]. Соединение молекулярной характеристики опухоли с клинической картиной - персональная онкогенетика - может обосновать ответ на лечение, предложить возможные варианты терапии, направленные на подавление конкретного генетического драйвера, или определить неэффективную терапию для конкретного случая.

Время получения результатов, важных с медицинской точки зрения, имеет решающее значение для случаев рака высокого риска, которые могут включать, например:

- метастатический рак,
  - опухоли ЦНС с плохим прогнозом (диффузная глиома, глиобластома поздних стадий, атипичная ратоглиомно-рабдоидная опухоль, эпендимомы и др.),
  - нейробластомы или рабдомиосаркомы IV стадии,
  - редкие раковые заболевания без известного курса лечения.
- Биоинформатический анализ реального времени данных секвенирования ДНК (из опухоли и крови) и РНК (только из опухоли) позволяет провести молекулярное профилирование опухоли, включая уникальные однонуклеотидные полиморфизмы, структурную вариацию, вариацию числа копий генов, эпигенетический профиль и уровень экспрессии генов. Анализ генома опухоли объединяет клинически значимые геномные события, обнаруженные в опухоли. Подробная информация об этих событиях связана с терапевтическими, биологическими, прогностическими и диагностическими доказательствами. Всесторонний геномный отчет с интерпретацией результатов содержит рекомендательные и действенные меры для клиницистов. Медицинские онкологи могут использовать эту информацию для принятия более информированного решения о лечении. Полученный молекулярный профиль опухоли может быть использован для нахождения новых терапевтических целей или более точного выбора известных терапевтических средств [3]. Данные эпигенетического анализа помогут в моделировании и идентификации молекулярных соединений, которые могут модифицировать эпигенетический профиль. Все эти меры направлены на совершенствование курса лечения, который улучшит выживаемость и качество жизни больных раком.

### Литература:

1. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. *Cancer Genome Landscapes // Science*. - 2013. - 339(6127). - p. 1546–1558. <http://doi.org/10.1126/science.1235122>.
2. Lili, L. N., Matyunina, L. V., Walker, L. D., Daneker, G. W., & McDonald, J. F. *Evidence for the Importance of Personalized Molecular Profiling in Pancreatic Cancer // Pancreas*. - 2014. - 43(2). - p. 198–211. <http://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000020>.
3. Laskin J., Jones S., Aparicio S., Chia S. et al. *Lessons learned from the application of whole-genome analysis to the treatment of patients with advanced cancers. Cold Spring Harbor molecular case studies*, 1(1), a000570.

UDC 57.087.1:616-006

## PERSONALIZED MOLECULAR PROFILING IN HIGH-RISK CANCERS

**Ponomarev A.V.**

Langara College, Vancouver, Canada 100 W 49th Ave, Canada, British Columbia, Vancouver, BC V5Y 2Z6 e-mail: andrew.ponomarev@gmail.com

Molecular profiling of the individual cancer genome can give an understanding of oncogenic events in relapsed, refractory or progressive cancers and tumors in which diagnosis cannot be determined by conventional molecular, genetic and histologic markers.

**Key words:** molecular profiling, high-risk cancers, cancer genome, bioinformatics, therapeutic response, personal oncogenomics

For effective cancer treatment, it is necessary to understand what genetic mutations are drivers of tumor development, and which ones are making it more aggressive or resistant to the treatment [1]. Primary tumors with known poor prognosis (high-risk cancers) and cancers that have failed upfront therapies and/or have very low likelihood of cure are subjects for personalized molecular profiling [2]. The combination of the clinical history of a patient and molecular profile of their tumor - personal oncogenomics - can help explain a response to the treatment, suggest possible therapies aimed at suppressing a specific genetic driver, or predict ineffective therapy for a particular case.

Turnaround time to receive medically actionable findings can be critical for high-risk cancer cases which can include but are not limited to :

- metastatic cancers
- CNS tumors with poor prognosis (e.g. DIPG, High-Grade Glioma, AT/RT, ependymoma, and others)
- stage IV neuroblastoma, or stage IV rhabdomyosarcoma
- rare cancers, regardless of apparent prognosis, where therapeutic options are unknown/poorly defined

Real-time bioinformatics analysis of DNA (from tumor and blood) and RNA (from tumor only) sequencing data can determine the molecular profile of the tumor, including unique single nucleotide polymorphisms, structural variants, copy number variations, epigenetic profiles, and gene expression level. Tumor genome analysis summarizes the clinically relevant genomic events detected in a tumor. Details of the events are associated with therapeutic, biological, prognostic, and diagnostic evidence.

A comprehensive genomic report with an interpretation of the results can be shared with the clinicians and tumor board to decide if the provided information was informative or actionable, and if it could be used to inform the treatment being given to the patient.

The resulting molecular profile of the tumor could be used to identify new therapeutic targets or to select precise candidates from known therapeutic agents [3]. Epigenetic analysis data will help in the modeling and identification of the molecular compounds that can modify the epigenetic profile of the cancer. All these measures are dedicated to refining the course of treatment which will improve survival and quality of life of cancer patients.

### References:

4. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. *Cancer Genome Landscapes* // *Science*. - 2013. - 339(6127). - p. 1546–1558. <http://doi.org/10.1126/science.1235122>.
5. Lili, L. N., Matyunina, L. V., Walker, L. D., Daneker, G. W., & McDonald, J. F. *Evidence for the Importance of Personalized Molecular Profiling in Pancreatic Cancer*. // *Pancreas*. - 2014. - 43(2). - p. 198–211. <http://doi.org/10.1097/MPA.000000000000020>.
6. Laskin J., Jones S., Aparicio S., Chia S. et al. *Lessons learned from the application of whole-genome analysis to the treatment of patients with advanced cancers*. *Cold Spring Harbor molecular case studies*, 1(1), a000570.

УДК 612.084

## ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ

Шаронов Г.В., Барбашова Л.Н., Южакова Д.В., Жигалова Е.А., Клементьева Н.В., Чудаков Д.М.

НИИ БМТ, Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

Транскриптомный анализ уже эффективно используется в иммунотерапии рака, однако его потенциал раскрыт далеко не полностью. На линейной мышинной модели меланомы мы разработали схему иммунотерапии, выделения и транскриптомного анализа субпопуляций опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TILs) с целью поиска новых возможностей использования транскриптомных данных.

**Ключевые слова:** иммунотерапия рака; онкоиммунология; контрольные точки иммунного ответа; CTLA-4; меланома; опухоль-инфильтрирующие лимфоциты.

Подходы, основанные на полногеномном секвенировании, стремительно внедряются и имеют все основания стать основой для классификации, прогнозирования и подбора терапии рака. В онкоиммунологии транскриптомный анализ используется для идентификации опухолевых неоантигенов, анализа состояния противоопухолевого иммунитета и прогноза терапии антителами к определенным контрольным точкам иммунного ответа. Доступность и изобилие транскриптомных данных клинических исследований ускоряет внедрение этого подхода в практику, но обуславливает дефицит детальных исследований на животных моделях. Клинические данные позволяют выявить корреляции между определёнными генетическими признаками и клиническим эффектом, но не позволяют установить причинно-следственные связи и механизмы противоопухолевого иммунного ответа при иммунотерапии. Отсутствие понимания этого механизма существенно ограничивает возможности использования транскриптомного анализа.

Линейные животные модели лишены вариабельности, характерной для клинических исследований, обеспечивают унификацию генетики опухоли и иммунной системы, а также дают возможность управлять временными параметрами эксперимента. Это позволяет выявить причинно-следственные связи и более тонкие закономерности, не видимые в высоко вариабельных клинических данных. В данной работе мы использовали модель подкожной меланомы B16F0 у трансгенных мышей C57BL/6-FoxP3GFP. Для данной модели нами была разработана схема анти-CTLA-4 иммунотерапии, которая обеспечивает замедление опухолевой прогрессии у 40% мышей и возможность выделения четырех CTLA-4-позитивных субпопуляций TILs (CD4 T-, CD8 T-, регуляторные T- и B-клетки). Схема была разработана, исходя из необходимости выделения достаточного количества каждой из субпопуляций TILs (не менее 2000 клеток) через 7 дней после начала иммунотерапии, как в случае отсутствия терапевтического эффекта, так и для замедливших рост опухолей. Также проведен количественный анализ субпопуляционного состава TILs. В докладе представлены данные сравнительного анализа TILs групп мышей с анти-CTLA-4 терапией и без, а также обсуждаются новые возможности использования этих данных для повышения эффективности иммунотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации №14.W03.31.0005.



UDC 612.084

## THE WAYS TO INCREASE IMMUNOTHERAPY EFFICACY ON THE BASIS OF TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES

Sharonov G.V., Barbashova L.N., Yuzhakova D.V., Zhigalova E.A. Klementeva N.V., Chudakov D.M.

Research Institute of Biomedical Technologies, Privolzhskiy Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

Transcriptome analysis is already effectively used in cancer immunotherapy; however, its potential is far from being exhausted. We have elaborated a model of mouse melanoma together with a protocol for isolation and transcriptome analysis of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) aiming to find new ways for use of these data.

**Key words:** cancer immunotherapy; oncoimmunology; immune checkpoints; CTLA-4; melanoma; tumor-infiltrating lymphocytes.

Whole genome sequencing approaches are increasingly involved in and have a solid ground to become key methods for cancer classification, prognosis, and choice of therapy. In oncoimmunology, the transcriptome analysis is used for neoantigen identification, analysis of anticancer immunity and prognosis of certain immunotherapy effectiveness. Broad availability of human transcriptome data from clinical studies accelerates their utility in practice, but underlines the lack of the relevant data on animal models. Clinical data allows one to reveal correlation of genetic traits with clinical outcomes, but fails to establish a cause-to-effect relationship and immunotherapy activated immune pathways. The lack of understanding of these pathways severely hampers the development of new ways for transcriptome data usage.

Linear animal models are devoid of variability, that is intrinsic for clinical studies, provide unified genetic and immunologic background and allow one to control experiment timing. This permit elucidating cause-to-effect relationship and revealing relationships that are masked by high variability in clinical settings. In the current study, we have used mouse model of subcutaneous melanoma B16F0 in transgenic C57BL/6-FoxP3GFP mice. For this model, we have developed anti-CTLA-4 therapy scheme, that provides suppression of tumor growth in 40% of animals and allows to extract four CTLA-4-positive TILs subsets (CD4 T-, CD8 T-, regulatory T- and B-cells). Prerequisite for this scheme is the ability to isolate a sufficient number of TILs in each subset (more than 2000 cells) both from animals without therapeutic effect and from those with reduced tumor progression. Quantitative analysis of TILs subsets has been performed as well. We will present a comparative analysis of TILs subsets with and without anti-CTLA-4 therapy and discuss possibilities to use transcriptome data to increase effectiveness of immunotherapy.

Research is supported by grant of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation Number 14.W03.31.0005.

УДК 577.29

## РОЛЬ ГЕНА IGFBR6 В ИНВАЗИИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Никulin С.В.<sup>1,2</sup>, Захарова Г.С.<sup>2</sup>, Полозников А.А.<sup>3</sup>, Алексеев Б.Я.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт, Москва, Россия  
 141701, Московская область, Долгопрудный, Институтский переулок, д.9  
 e-mail: nikulin.c.b@gmail.com

<sup>2</sup> ООО НТЦ "БиоКлиникум", Москва, Россия  
 115088, Москва, ул. Угрешская, д.2, стр.85

<sup>3</sup> ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия  
 249036, Калужская область, Обнинск, ул. Королева, д.4

Был проведен нокдаун гена IGFBR6 в клетках рака молочной железы MDA-MB-231. Было показано, что снижение экспрессии гена IGFBR6 приводит к увеличению скорости пролиферации, снижению миграционной активности, повышенной активности матриксных металлопротеиназ и к изменению экспрессии некоторых генов, ассоциированных с эпителиально-мезенхимальным переходом.

**Ключевые слова:** IGFBR6, рак молочной железы, метастазирование, рецидив, эпителиально-мезенхимальный переход, коллективная инвазия, индивидуальная инвазия

Рак молочной железы (РМЖ) является самым часто встречающимся типом рака, а также основной при-

чиной смерти от злокачественных новообразований среди женщин по всему миру [1]. Чаще всего к смерти пациентов приводит возникновение рецидива, проявляющегося в виде отдаленных метастазов, не поддающихся терапии. На сегодняшний день разработан целый ряд генетических тестов, позволяющих предсказать развития рецидива РМЖ (OncotypeDX, MammaPrint, Prosigna и др.). Ранее в нашей лаборатории был создан собственный классификатор для выявления пациентов с высоким риском развития рецидива РМЖ, основанный на измерении экспрессии всего двух генов ELOVL5-IGFBP6 [2]. Было показано, что качество данного классификатора не уступает перечисленным выше аналогам, учитывающим уровни экспрессии нескольких десятков генов.

Метастазирование является комплексным процессом, на первом этапе которого происходит инвазия злокачественных клеток в соседние ткани [3]. Существуют различные механизмы инвазии раковых клеток [4]. В частности, опухолевые клетки при помощи эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) могут переходить в мезенхимальное состояние и приобретать подвижность (индивидуальная инвазия). С другой стороны, инвазия может осуществляться за счет разложения внеклеточного матрикса и активной пролиферации раковых клеток, соединенных друг с другом (коллективная инвазия). Целью данной работы было изучение роли гена IGFBP6 в инвазии клеток РМЖ. Для этого был проведен нокадаун гена IGFBP6 в клетках рака молочной железы MDA-MB-231 и получена стабильная клеточная линия.

Было показано, что пониженная экспрессия гена IGFBP6 приводит к двукратному росту скорости пролиферации раковых клеток, при этом значительно снижается их миграционная активность. Также была изучена экспрессия матриксных металлопротеиназ и генов ЭМП. Было показано, что в клетках с нокадауном гена IGFBP6 сильно повышена экспрессия MMP1 и MMP3. Увеличение активности матриксных металлопротеиназ дополнительно было подтверждено при помощи зимографии.

Также было выявлено, что снижение уровня экспрессии гена IGFBP6 привело к изменению экспрессии многих генов, участвующих в ЭМП (CDH1, CDH2, SNAI1, SNAI2). При этом на основании полученных данных по экспрессии генов ЭМП нельзя сделать вывод о переходе клеток в мезенхимальное состояние, что дополнительно подтверждается снижением миграционной активности.

Таким образом, из полученных данных можно сделать вывод, что диссеминация опухолевых клеток с пониженной экспрессией гена IGFBP6 происходит преимущественно за счет коллективной инвазии.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (УИПНИ RFMEFI61316X0058).

#### Литература:

1. Torre L.A. et al. *Global Cancer Statistics, 2012* // *CA. Cancer J. Clin.* 2015. Vol. 0, № 0. P. 1–22.
2. Galatenko V. V et al. *Highly informative marker sets consisting of genes with low individual degree of differential expression* // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 5, № 1. P. 14967.
3. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. *Emerging Biological Principles of Metastasis* // *Cell. Elsevier Inc.*, 2017. Vol. 168, № 4. P. 670–691.
4. Friedl P. et al. *Classifying collective cancer cell invasion* // *Nat. Cell Biol. Nature Publishing Group*, 2012. Vol. 14, № 8. P. 777–783.

UDC 577.29

## ROLE OF IGFBP6 GENE IN INVASION OF BREAST CANCER CELLS

Nikulin S.V.<sup>1,2</sup>, Zakharova G.S.<sup>2</sup>, Poloznikov A.A.<sup>3</sup>, Alekseev B.Ya.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia*  
141701, Moscow Region, Dolgoprudny, Institutskiy per., 9  
e-mail: nikulin.c.b@gmail.com

<sup>2</sup> *BioClinicum Research and Development Center, Moscow, Russia*  
115088, Moscow, Ugreshskaya str., 2/85

<sup>3</sup> *National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia*  
249036, Kaluga Oblast, Obninsk, Koroleva str., 4

Knockdown of IGFBP6 gene in breast cancer cells MDA-MB-231 has been performed. It has been shown that a decrease in the expression of IGFBP6 gene leads to an increase in the proliferation rate, a decrease in migration activity, increased activity of matrix metalloproteinases, and altered expression of several genes associated with epithelial-mesenchymal transition.

**Key words:** IGFBP6, breast cancer, metastasis, relapse, epithelial-mesenchymal transition, collective invasion, individual invasion

Breast cancer is the most common type of cancer, and the leading cause of cancer death among women around the world [1]. Non-treatable relapse, manifested as distant metastases, is the most often cause of patients' deaths. To date, a number of genetic tests have been developed to predict breast cancer relapse (OncotypeDX, MammaPrint, Prosigna, etc.). Previously in our laboratory a classifier has been created to identify patients at high risk of breast cancer recurrence [2]. This test is based on the measurement of the expression of just two genes ELOVL5-IGFBP6. It has been shown that the quality of this classifier is comparable to the analogs, estimating the expression levels of dozens of genes.

Metastasis is a complex process, the first stage of which involves the invasion of malignant cells into neighboring tissues [3]. There are different mechanisms of invasion of cancer cells [4]. In particular, tumor cells can be transformed into a mesenchymal state by means of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and acquire motility (individual invasion). On the other hand, the invasion can be driven by decomposition of the extracellular matrix and active proliferation of cancer cells connected to each other (collective invasion). The aim of this work was to study the role of the IGFBP6 gene in the invasion of breast cancer cells. For this purpose, knockdown of the IGFBP6 gene in the breast cancer cells MDA-MB-231 has been carried out and a stable cell line has been generated.

It has been shown that reduced expression of the IGFBP6 gene leads to a twofold increase in the proliferation rate of cancer cells, while their migration activity is significantly reduced. Expression of matrix metalloproteinases and EMT genes has also been studied. It has been shown that expression levels of MMP1 and MMP3 are greatly increased in the cells with knockdown of the IGFBP6 gene. The increase in the activity of matrix metalloproteinases has been additionally confirmed by means of zymography.

It has also been revealed that reduction of the expression of the IGFBP6 gene alters the expression of many EMT genes (CDH1, CDH2, SNAI1, SNAI2). However, it cannot be concluded that the cells have transformed into mesenchymal state, based on the obtained data on the expression of EMT genes. This statement is further supported by the decrease in migration activity.

Thus, it can be concluded from obtained data, that dissemination of tumor cells with reduced expression of the IGFBP6 gene occurs primarily through collective invasion.

The study was supported by the Federal Target Program "Research and Development in Priority Areas of Advancement of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014-2020" (RFMEFI61316X0058).

#### References:

1. Torre L.A. et al. *Global Cancer Statistics, 2012* // *CA. Cancer J. Clin.* 2015. Vol. 0, № 0. P. 1–22.
2. Galatenko V. V et al. *Highly informative marker sets consisting of genes with low individual degree of differential expression* // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 5, № 1. P. 14967.
3. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. *Emerging Biological Principles of Metastasis* // *Cell. Elsevier Inc.*, 2017. Vol. 168, № 4. P. 670–691.
4. Friedl P. et al. *Classifying collective cancer cell invasion* // *Nat. Cell Biol. Nature Publishing Group*, 2012. Vol. 14, № 8. P. 777–783.

УДК 577.21

## ЦИКЛИЧЕСКИЕ РНК: ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Филиппенков И.Б.<sup>1</sup>, Ставчанский В.В.<sup>1</sup>, Денисова А.Е.<sup>2</sup>, Лимборская С.А.<sup>1,2</sup>, Дергунова Л.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия

123182, Москва, пл. академика И.В. Курчатова, д.2

e-mail: [Filippenkov@img.ras.ru](mailto:Filippenkov@img.ras.ru)

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

117997, Москва, ул. Островитянова д.1

В тканях человека и грызунов обнаружены представители нового типа некодирующих РНК циклической природы. Работа посвящена исследованию механизмов их образования и особенностей экспрессии во взрослых и эмбриональных тканях. Получены результаты, указывающие на функциональную роль циклических РНК в ответе клеток мозга на ишемию.

**Ключевые слова:** церебральная ишемия, альтернативный сплайсинг, рекурсивные экзоны, мозгоспецифическая экспрессия, некодирующие РНК, циклические РНК, микроРНК.

Совсем недавно появились данные о новом типе длинных некодирующих РНК, которые имеют циклическую топологию и предположительно выполняют ряд важных регуляторных функций в клетке. Они образуются в процессе бексплайсинга из пре-мРНК белок-кодирующих генов и сопутствуют образованию мРНК [1]. К изучению циклических РНК (циклоРНК) мы пришли в процессе исследования особенностей структуры и экспрессии гена *SGMS1* человека. Данный ген кодирует фермент сфингомиелинсинтазу 1, который обеспечивает синтез сфингомиелина и диацилглицерина из фосфатидилхолина и церамида. С использованием комплекса современных методов анализа транскриптома, включая высокопроизводительное секвенирование РНК «RNA CaptureSeq», Нозерн-блот анализ, ПЦР в реальном времени, помимо мРНК, обеспечивающих синтез белка, нам удалось выявить 13 циклоРНК, которые преимущественно содержали последовательности мультиэкзонной 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) гена. В составе 6 выявленных циклоРНК гена *SGMS1* нами были обнаружены рекурсивные (RS) экзоны, которые принимают участие в поэтапном сплайсинге длинных интронов гена. На примере циклоРНК гена *SGMS1* человека нами была предложена модель образования циклоРНК из пре-мРНК с участием RS-экзонов – рекурсивного бексплайсинга. Была установлена структура циклоРНК ортологичных генов *Sgms1* крысы и мыши. Они имели меньшее структурное разнообразие: преимущественно содержали последовательности мультиэкзонной 5'-НТО гена, при этом в их составе не было обнаружено RS-экзонов, что может указывать на различия в механизмах процессинга РНК между человеком и грызунами. Анализ содержания циклоРНК данного гена в разных тканях человека и грызунов с помощью ПЦР в реальном времени показал, что они преимущественно представлены в отделах мозга. Также было показано, что в процессе эмбрионального развития мозга крыс уровень циклоРНК гена *Sgms1* возрастал значительно быстрее, чем увеличивалось содержание его мРНК.

Следующим этапом анализа циклоРНК стало изучение их роли в мозге крыс в условиях церебральной ишемии. Мы использовали модель обратимой фокальной ишемии мозга крыс, которая заключалась в эндovasкулярной окклюзии правой средней мозговой артерии (СМАО) с помощью монофиламента в течение 90 минут, последующего его изъятия и восстановлении кровотока. Очаг повреждения локализовался в подкорковых структурах мозга. Животных выводили из эксперимента методом декапитации через 24 часа после начала эксперимента. В подкорковых структурах мозга крыс в условиях обратимой СМАО была исследована экспрессия генов нейротрансмиссивных систем – глутаматных метаболитных рецепторов (*Grm3* и *Grm5*), ГАМК-А ионотропного рецептора (*Gabra5*) и фосфолипазы C (*Plcb1*). Нами была определена структура 4 циклических РНК, которые кодируются данными генами. С помощью ПЦР в реальном времени нам удалось выявить, что через 24 часа после окклюзии уровень мРНК всех исследуемых генов был достоверно снижен, а циклоРНК либо незначительно снижался, либо оставался без изменений, что может быть следствием устойчивости циклоРНК в условиях ишемического повреждения. Функциональное значение циклоРНК в настоящее время активно изучается. Предполагают, что они могут, играть роль молекулярных губок и связывать значительное количество микроРНК, удаляя их тем самым из клеточного пула. С помощью анализа базы данных STarMir мы выяснили распределение сайтов связывания микроРНК вдоль молекулы мРНК генов *GRM3* и *GRM5* человека, высоко гомологичных соответствующим генам крысы. Было выявлено большое число сайтов связывания микроРНК внутри экзонов, которые кодируют циклоРНК. Таким образом, данные циклоРНК имеют значительный потенциал к сорбции микроРНК. Полученные результаты могут указывать на функциональную роль циклоРНК исследуемых генов в качестве конкурентных эндогенных РНК в ответе клеток мозга на ишемию, что может определять их значение в качестве перспективных нейропротективных агентов и обозначить принципиально новые подходы для дальнейшей разработки препаратов направленного нейропротективного воздействия на основе некодирующих РНК.

Работа по изучению циклических РНК гена сфингомиелинсинтазы 1 выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (грант №16-04-00488); по изучению роли циклических РНК при ишемии – при поддержке гранта Российского научного фонда (грант №17-74-10189).

*Литература:*

1. Filippenkov I.B., Kalinichenko E.O., Limborska S.A., Dergunova L.V. Circular RNAs-one of the enigmas of the brain. // *Neurogenetics*. 2017. Vol. 18, № 1. P. 1–6.

УДК 577.21

## CIRCULAR RNA: PECULIARITIES OF EXPRESSION IN THE NORM AND IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

Filippenkov I.B. <sup>1</sup>, Stavchansky V.V. <sup>1</sup>, Denisova A.D. <sup>2</sup>, Limborska S.A. <sup>1,2</sup>, Dergunova L.V. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
 123182, Moscow, Kurchatov Sq. 2  
 e-mail: Filippenkov@img.ras.ru

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia  
 117997, Moscow, Ostrovityanova St. 1

The representatives of a new type of non-coding RNAs of circular topology were found in human and rodent tissues. The work is devoted to the study of the mechanisms of circular RNA formation and the peculiarities of their expression in adult and embryonic tissues. The obtained results indicate the functional role of circular RNAs in the response of brain cells to ischemia.

**Key words:** cerebral ischemia, alternative splicing, recursive exons, brain-specific expression, noncoding RNAs, circular RNA, microRNA.

Recently, data about a new type of long non-coding RNAs that have circular topology and presumably perform a number of important regulatory functions in cell have appeared. Such circular RNAs (circRNAs) accompany the mRNA formation and are formed by the backsplicing from the pre-mRNA of protein-coding genes [1]. We come to the study of circRNAs through the analysis of peculiarities of the structure and expression of the human SGMS1 gene. This gene encodes the enzyme sphingomyelin synthase 1, which provides the synthesis of sphingomyelin and diacylglycerol from phosphatidylcholine and ceramide. In addition to mRNAs providing protein synthesis, 13 circRNAs that predominantly contained sequences of the multi-exon 5'-untranslated region of the gene (5'-UTR) were identified by the complex of the modern methods of transcriptome analysis, including high-throughput RNA sequencing "RNA CaptureSeq", Northern blot analysis, real-time PCR. Within 6 circRNAs of the SGMS1 gene the recursive (RS) exons that participate in the multi-step splicing of long introns of the gene were found. Based on the human SGMS1 circRNAs formation from pre-mRNA with the participation of RS-exons, the model of recursive backsplicing was proposed. The circRNA structure of orthologous rat and mouse Sgms1 genes was also established. They had smaller structural diversity particularly contained sequences of multi-exon 5'-UTR, and had no RS-exons in their composition. It could indicate the differences of the mechanisms of RNA processing between humans and rodents. Real-time PCR analysis of circRNAs of sphingomyelin synthase 1 gene level in various human and rodent tissues showed their predominance in the brain. It has also been shown that during rat embryonic brain development the level of the circRNA of Sgms1 gene was increased more rapidly compared to mRNA level.

At the next stage role of circRNAs in the rat brain in condition of cerebral ischemia was studied. We used the model of transient focal rat brain ischemia, which was induced by endovascular occlusion of the right middle cerebral artery (MCAO) with monofilament for 90 minutes and subsequent restoration of blood flow. The damage focus was localized in the subcortex. The animals were decapitated at 24 hours after the beginning of the experiment. The expression of the genes for neurotransmitter systems especially for glutamate metabotropic receptors (Grm3 and Grm5), GABA-A ionotropic receptor (Gabra5) and phospholipase C (Plcb1) in condition of transient MCAO was investigated. The structure of 4 circRNAs, which are encoded by these genes, was determined. Using real-time PCR, we found that mRNA level of all investigated genes was significantly lowered but circRNAs level was either decreased slightly or remained unchanged at 24 hours after occlusion. We proposed that it might be due to higher stability of the circRNAs in ischemic injury conditions. The functional significance of circRNAs is currently being actively studied. It is assumed that they can play the role of molecular sponges and can sorb significant amount of microRNAs, thereby removing them from the cell pool. Using STarMir database analysis, we found out the distribution of the microRNA binding sites along the mRNAs of human GRM3 and GRM5 genes, which were highly homologous to the corresponding rat genes. A large number of microRNA binding sites were found inside the exons that encode the circRNAs. The latter could propose significant potential for microRNA sorption. In generally, the obtained results may indicate the functional role of the circRNAs of the investigated genes as competitive endogenous RNAs in the brain cells response to

ischemia. It can determine significance of circRNAs as promising neuroprotective agents and designate principally new approaches for the further development of directed neuroprotective agents based on the non-coding RNAs.

The work on the study of circRNAs of the sphingomyelin synthase 1 gene was supported by grant of the Russian Foundation for Basic Research (№16-04-00488). The study of the role of circRNAs in condition of cerebral ischemia was supported by grant of the Russian Science Foundation (№17-74-10189).

*References:*

1. Filippenkov I.B., Kalinichenko E.O., Limborska S.A., Dergunova L.V. *Circular RNAs-one of the enigmas of the brain.* // *Neurogenetics.* 2017. Vol. 18, № 1. P. 1–6.

## СОВРЕМЕННАЯ ИММУНОЛОГИЯ

### MODERN IMMUNOLOGY

1. СРГ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ИХ ДЕНДРИМЕРНЫЕ ФОРМЫ КАК ИММУНОАДЪЮВАНТЫ В ВАКЦИНАХ, Смирнова А.С., Гудов В.П., Ткачук А.П., Гушин В.А. ....	375
CPG OLIGONUCLEOTIDES. DENDRIMERIC FORMS AS IMMUNOADJUVANTS IN VACCINES, Smirnova A.S., Gudov V.P., Tkachuk A.P., Guschin V.A. ....	376
2. АКТИВАЦИЯ CD39+FOXP3+ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ, Чуров А. В., Бабалык А. В. ....	378
ACTIVATION OF CD39+FOXP3+ REGULATORY T-CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER, Churov A. V., Babalyk A. V. ....	379
3. АФФИНОСТЬ С ОЛИГОМЕРНЫМ ШАПЕРОНОМ GROEL КАК ПОКАЗАТЕЛЬ КОНФОРМАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, Цукур А.А., Ломкова Е.А., Топкова О.В. ....	380
AFFINITY WITH OLIGOMERIC CHAPERONE GROEL AS AN INDICATOR OF CONFORMATIONAL STABILITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, Tsukur A.A., Lomkova A.A., Topkova O.V. ....	381
4. БЕСКОНТАКТНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ ПО ВЫДЫХАЕМОМУ ВОЗДУХУ, Ю.М.Шляпников, А.Ю.Михеев, А.А.Николаев, Е.А.Шляпникова, Т.Р.Багдасарьян, И.А.Бурмистрова, Т.Г.Смирнова, И.Ю.Андриевская, Е.Е.Ларионова, И.В.Лядова, В.Н.Морозов ....	382
NON-INVASIVE DIAGNOSTICS FOR PULMONARY TUBERCULOSIS USING EXHALED AIR, Y.Shlyapnikov, A.Mikheev, A.Nikolaev, E.Shlyapnikova, T.Bagdasaryan, Burmistrova, T.Smirnova, I.Andrievskaya, E.Larionova, I.Lyadova, V.Morozov ....	383
5. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АЛЛЕРГЕНОВ FRA A 1 И FRA A 3 ИЗ КЛУБНИКИ FRAGARIA ANANASSA, Зазыкина А.Д., Мельникова Д.Н., Богданов И.В., Овчинникова Т.В. ....	384
BIOTECHNOLOGICAL METHOD FOR PRODUCTION AND INVESTIGATION OF PROPERTIES OF ALLERGENS FRA A 1 AND FRA A 3 FROM STRAWBERRY FRAGARIA ANANASSA, Zazykina A.D., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Ovchinnikova T.V. ....	385
6. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА ГЛАВНОГО АЛЛЕРГЕНА AMB A 1 АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA, Романова Т.В., Мельникова Д.Н., Богданов И.В., Овчинникова Т.В. ....	386
BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF THE MAJOR ALLERGEN AMB A 1 OF THE COMMON RAGWEED AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA, Romanova T.V., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Ovchinnikova T.V. ....	386
7. ВЫЯВЛЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО АНТИГЕНА МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ГКР-ДЕТЕКЦИЕЙ СИГНАЛА, Кудряшова А.М., Галстян А.Г.1. Файзулов Е.Б. , Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В., Зверев В.В., Борисова О.В. ....	387
DETECTION OF ADENOVIRUS ANTIGEN BY A SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, Kudryashova A.M., Galstyan A.G., Faizulov E.B. , Olenin A.Yu., Lisichkin G.V., Zverev V.V., Borisova O.V.1 ....	388
8. ИЗУЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ ДИСПЕРСИИ Фуллерена C60, Е.А.Турецкий, С.М.Андреев, Н.Н.Шершакова, О.Ю.Камышников, Е.И.Кукс, В.В.Смирнов, М.Р.Хайтов ....	389
STUDY OF SUB-ACUTE TOXICITY OF FULLERENE C60 AQUEOUS DISPERSION, E.Turetskiy, S.Andreev, N.Shershakova, O.Kamysnikov, E.Kuks, V.Smirnov, M.Khaitov ....	390
9. ИММУННЫЙ СТАТУС КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО СНИЖЕНИЯ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ЭССЕНЦИАЛЬНЫМИ НУТРИЕНТАМИ, Требух М.Д., Садыкова Э.О., Шестакова С.И., Тышко Н.В. ....	391
IMMUNE STATUS OF RATS UNDER CONDITIONS OF ESSENTIAL NUTRIENTS' GRADUAL DECLINE, Trebukh M.D., Sadykova E.O., Shestakova S.I., Tyshko N.V. ....	392
10. ИММУНОАДЪЮВАНТЫ ДЛЯ ВАКЦИН: ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ И ИННОВАЦИОННЫЕ БИОПЛАТФОРМЫ, Ю.М. Васильев ....	393
IMMUNE ADJUVANTS FOR VACCINES: PROBLEMS, PERSPECTIVES AND INNOVATIVE BIOPLATFORMS, Y.M. Vasiliev ....	394

11. ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ, Михайлова Н.А., Калошин А.А., Зими́на Е.М., Солдатенкова А.В. ....	395
IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF PSEUDOMONAS RECOMBINANT VACCINE, Mihailova N.A., Kaloshin A.A, Zimina E.M., Soldatenkova A.V. ....	396
12. КОНТАМИНАЦИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК ОРТОРЕОВИРУСАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ, Файзулоев Е.Б., Корчевая Е.Р., Марков Д.В., Петруша О.А. ....	396
CONTAMINATION OF CELL CULTURES BY MAMMALIAN ORTHOREOVIRUSES, Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Markov D.V., Petrusha O.A. ....	398
13. MULTIFACTOR ANALYSIS OF PROTEINS SORPTION ON COLLOIDAL GOLD FOR OBTAINING OF BIOANALYTICAL REAGENTS, Sotnikov D.V., Ivanov V.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	399
MULTIFACTOR ANALYSIS OF PROTEINS SORPTION ON COLLOIDAL GOLD FOR OBTAINING OF BIOANALYTICAL REAGENTS, Sotnikov D.V., Ivanov V.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	399
14. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ БЛОКАТОРАМИ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ, Крамарь Т.В., Голубинская Е.П. ....	400
MORPHOFUNCTIONAL JUSTIFICATION OF TARGET THERAPY WITH ANGIOGENESIS BLOCKERS IN FIBRO-CAVERNOUS TUBERCULOSIS OF LUNGS, Kramar T.V., Golubinskaya E.P. ....	401
15. НАНОЧАСТИЦЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СКАФФОЛДОВЫМ БЕЛКОМ DARPIN9.29, ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ К HER2/NEU-СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИМ РАКОВЫМ КЛЕТКАМ, Шипунова В. О., Никитин М. П., Деев С. М. ....	402
NANOPARTICLES MODIFIED WITH SCAFFOLD PROTEIN DARPIN9.29 FOR TARGETED DELIVERY TO HER2/NEU-OVEREXPRESSING CANCER CELLS, Shipunova V. O., Nikitin M. P., Deyev S. M. ....	403
16. НОВАЯ ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЛУТЕИНИЗИРУЮЩЕМУ ГОРМОНУ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ, Порываева В.А., Могильных А.К., Агафонова О.А., Вторушина И.А., Усикова Л.А., Рукавишников М.Ю. ....	404
A NEW DIAGNOSTIC PANEL OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN LUTEINIZING HORMONE, Poryvaeva V.A., Mogilnykh A.K., Agafonova O.A., Vtorushina I.A., Usikova, L.A., Rukavishnikov M.Yu. ....	405
17. НОВЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, Бязрова М.Г., Филатов А.В. ....	406
NEW METHODS OF HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY GENERATION, Byazrova M.G., Filatov A.V. ....	407
18. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ И ВРЕМЕНИ ЦИРКУЛЯЦИИ В КРОВИ МУЛЬТИМЕРНЫХ ПЕГИЛИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ, Холоденко Р.В., Калиновский Д.В., Доронин И.И., Деев С.М., Холоденко И.В. ....	407
ANALYSIS OF CYTOTOXIC EFFECTS AND CIRCULATION TIME IN THE BLOOD OF MULTIMERIC PEGYLATED FRAGMENTS OF GD2-SPECIFIC ANTIBODIES, Kholodenko R.V., Kalinovsky D.V., Doronin I.I., Deyev S.M., Kholodenko I.V. ....	408
19. ПЕРСПЕКТИВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ, Лазарева Н.М., Кудрявцев И.В., Серебрякова М.К., Баранова О.П. ....	409
PROSPECTS OF DETERMINATION OF T-HELPER CELLS SUBSETS BASED ON EXPRESSION OF CHEMOKINE RECEPTORS IN PATIENTS WITH SARCOIDOSIS, Lazareva N.M. , Kudryavtsev I.V. , Serebriakova M.K. , Baranova O.P. ....	410
20. ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛОГО ПСОРИАЗА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 (ИЛ-36РА) ЧЕЛОВЕКА, Колобов А.А., Кондратьева Е.В. , Кудлинг Т.В., Протасов Е.А., Калинин Р.С., Нимирицкий П.П., Александров Г.В., Петров А.В., Симбирцев А.С. ....	411
THERAPY FOR SEVERE PSORIASIS BASED ON RECOMBINANT INTERLEUKIN-36 RECEPTOR ANTAGONIST, Kolobov A.A., Kondratyeva E.V., Kudling T.V., Protasov E.A., Kalinin R.S., Nimiritsky P.P., Alexandrov G.V., Petrov A.V., Simbirtsev A.S. ....	412
21. ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК ДЛЯ ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, Лебедев Л.Р., Ермолаев В.В., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишкина Л.Н., Даниленко Е.Д. ....	413
PREPARATIONS BASED ON DOUBLE STRANDED RNA FOR EMERGENCY PREVENTION OF INFECTIOUS DISEASES, Lebedev L.R., Ermolayev V.V., Scarnovich M.O., Scarnovich M.A., Shishkina L.N., Danilenko E.D. ....	414



22. ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ РНК ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПОДХОДОВ К АНТИЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ, Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р., Камышников О.Ю., Иванова А.С., Хаитов М.Р. ....	414
TARGETING TO IL-4 GENE VIA RNA INTERFERENCE AS A NOVEL APPROACH FOR ANTICYTOKINE THERAPY OF BRONCHIAL ASTHMA, Shilovskiy I.P., Sundikova M.S., Gaisina A.R., Kamyshnikov O.Y., Ivanova A.S., Khaitov M.R. ....	415
23. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ТОТАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ДЕФЕНСИНОВ КРЫСЫ, Андреева Е.А., Янкевич И.А., Алешина Г.М. ....	416
DEVELOPMENT OF FLUORESCENT POLYCLONAL ANTIBODY AGAINST TOTAL FRACTION OF RAT DEFENSINS, Andreeva E.A., Yankelevich I.A., Aleshina G.M. ....	417
24. РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛ МИРНК ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РЕСПИРАТОРНОГО СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА ЧЕЛОВЕКА, Илюхина А.А., Шиловский И.П., Вишнякова Л.И., Гайсина А.Р., Хаитов М.Р. ....	418
DEVELOPMENT OF siRNA MOLECULES FOR THE SUPPRESSION OF HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS, Iliukhina A.A., Shilovskiy I.P., Vishnyakova L.I., Gaisina A.R., Khaitov M.R. ....	419
25. РАЗРАБОТКА НОВОГО СПОСОБА НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАННИХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ НЕЙРОБЛАСТОМЫ НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННОГО ГАНГЛИОЗИДА GD, И.И.Доронин, И.В.Холоденко, Т.В.Шаманская, С.М.Деев, Р.В.Холоденко ....	420
DEVELOPMENT OF A NEW METHOD OF NONINVASIVE DIAGNOSTICS OF EARLY STAGES OF NEUROBLASTOMA BASED ON DETERMINATION OF THE LEVEL OF TUMOR-ASSOCIATED GANGLIOSIDE GD, I.Doronin, I.Kholodenko, T.Shamanskaya, S. Deev, R.Kholodenko ....	421
26. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ СТИМУЛЯТОРОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, Даниленко Е.Д., Лебедев Л.Р., Левагина Г.М., Гамалей С.Г., Шишкина Л.Н., Усова С.В. ....	422
DEVELOPMENT OF NEW THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC MEDICINAL DRUGS BASED ON STIMULANTS OF NON-SPECIFIC RESISTANCE, Danilenko E.D., Lebedev L.R., Levagina G.M., Gamaley S.G., Shishkina L.N., Usova S.V. ....	423
27. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГМ-КСФ ЧЕЛОВЕКА, Есина Т.И., Волосникова Е.А., Гогина Я.С., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Гилева И.П. ....	424
ELABORATION OF THE METHOD FOR THE PURIFICATION OF RECOMBINANT HUMAN GM-CSF, Esina T.I., Volosnikova E.A., Gogina Y.S., Lebedev L.R., Danilenko E.D., Gileva I.P. ....	424
28. РЕГУЛЯТОРНАЯ ФУНКЦИЯ TYR-ФРАГМЕНТА NI(Fe)-ARD ДИОКСИГЕНАЗ В ЦИКЛЕ СИНТЕЗА МЕТИОНИНА И СО В МЕХАНИЗМЕ НОРМАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА, Матиенко Л.И., Бинюков В.И., Миль Е.М., Мосолова Л.А. ....	425
REGULATORY FUNCTION OF THE TYR-FRAGMENT OF NI(Fe)-ARD DIOXYGENASES ACTION IN THE CYCLE OF METHIONINE AND CO SYNTHESIS IN THE MECHANISM OF NORMAL HOMEOSTASIS, Matienko L.I., Binyukov V.I., Mil E.M., Mosolova L.A. ....	426
29. СОЗДАНИЕ БАНКА ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР РАКОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ФАРМСКРИНИНГА И ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ, Г.К.Рысцов, А.Н. Шибает, Ю.В. Павлова, К.С. Сорокин, В.Б. Кешелава, Д.С.Михайленко, Н.Г. Кешишев, М.Ю.Земскова ....	427
CREATION OF A BANK OF PRIMARY CULTURES OF HUMAN CANCER CELLS FOR PHARMACEUTICAL SCREENING AND PERSONIFIED MEDICINE, G.K.Rystsov, A.N. Shibaev, Y.V. Pavlova, K.S. Sorokin, V.B. Keshelava, D.S. Mihailenko, N.G. Keshishev, M.Y.Zemskova ....	429
30. СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У МЫШЕЙ, Никольский А.А., Шиловский И.П., Бабахин А.А., Гайсина А.Р., Камышников О.Ю., Хаитов М.Р. ....	430
DEVELOPMENT OF A MURINE MODEL OF NEUTROPHILIC BRONCHIAL ASTHMA, Nikolskii A.A., Shilovskiy I.P., Babakhin A.A., Gaisina A.R., Kamyshnikov O.Y., Khaitov M.R. ....	431
31. ЭТАПЫ СОЗДАНИЯ ЛЕЧЕБНОЙ ГРАНУЛИРОВАННОЙ ФОРМЫ КЛЕЩЕВОГО МИКСТ-АЛЛЕРГЕНА ДЛЯ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ, Бержец В.М., Хлгатян С.В., Петрова Н.С., Васильева А.В., Петрова С.Ю. ....	432
STUDY OF THE PROPERTIES OF THE MIXED HOUSE DUST MITE ALLERGEN WITH THE AIM OF CREATING A SUBLINGUAL FORM, Berzhets V. M., Khlgatian S.V., Petrova N.S., Vasilyeva A.V., Petrova S.Yu. ....	433

УДК 615.375

## СрG ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ИХ ДЕНДРИМЕРНЫЕ ФОРМЫ КАК ИММУНОАДЪЮВАНТЫ В ВАКЦИНАХ

Смирнова А.С., Гудов В.П., Ткачук А.П., Гуцин В.А.

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

123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

e-mail: goodofferan@gmail.com

Получены дендримерные молекулы СрG олигонуклеотидов с молекулярными массами 18671,2 г/моль и 55396,9 г/моль, предложены протоколы анализа полученных молекул при помощи физико-химических методов, готовая лиофилизированная форма проходит стадию доклинических испытаний в качестве кандидата иммуноадъюванта в составе вакцины.

**Ключевые слова:** вакцины, адъювант, СрG ДНК, Toll-like рецептор.

В настоящее время в борьбе с различными инфекционными заболеваниями наряду с созданием высокоэффективных вакцин, вызывающих каскад иммунных реакций и стойкий напряженный иммунитет, требуются компоненты, способные усилить данную реакцию организма на введение вакцины [1].

СрG олигонуклеотиды представляют собой фрагменты молекулы ДНК, которые содержат неметилированные СрG мотивы, обеспечивающие выраженный стимулирующий эффект на иммунную систему [2, 4, 8]. Такие молекулы взаимодействуют с клеточными рецепторами Toll-like 9 [5, 7], вызывая каскад реакций с выработкой противовоспалительных цитокинов и хемокинов.

Изучение свойств уже известных форм иммуностимулирующей ДНК и разработка новых открывают перспективы для создания и внедрения в медицинскую практику адъювантных вакцин и препаратов. В настоящее время вакцина для профилактики и лечения туберкулеза, созданная в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» и имеющая в своем составе в качестве адъюванта СрG олигонуклеотид линейной структуры, завершает IIa фазу стадии клинических испытаний (безопасность и иммуногенность).

Учитывая трехмерную конформацию и расположение линейки рецепторов Toll-like, распознающих чужеродные РНК и ДНК, были предложены структуры с большей молекулярной массой, представляющие собой дендримеры на основе линейной структуры СрG олигонуклеотида [6]. В связи с этим были синтезированы дендримерные молекулы олигонуклеотидов с использованием молекул разветвителей (рис.1), а также проведены выделение и очистка с последующим анализом свойств и структуры.

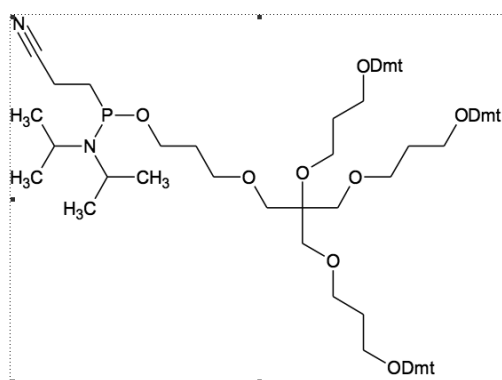


Рисунок 1. Химическая структура молекулы разветвителя.

Синтез дендримерной формы СрG олигонуклеотидов проводили на основе линейного олигонуклеотида 1826 твердофазным фосфорамидитным методом синтеза. Основу межнуклеотидных связей СрG ОДН 1826 (M=6346,9 г/моль, мышинные Toll-like 9 рецепторы) составляют фосфоротиоатные группы, повышающие срок жизни олигонуклеотида in vivo, что дает резистентность к действию клеточных нуклеаз. В ходе работы были получены дендримерные молекулы в двух кандидатных формах с молекулярной массой 18671,2 г/моль и 55396,9 г/моль соответственно (рис.2).

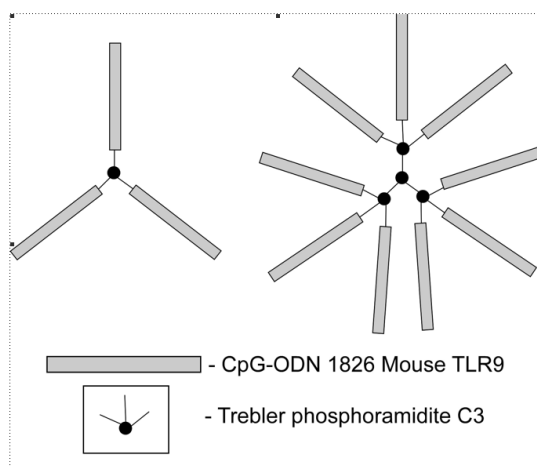


Рисунок 2. Схематичное структурное изображение дендримеров двух типов разветвления.

Полученные структуры охарактеризованы с помощью таких методов как ВЭЖХ, электрофорез, масс-спектрометрия (MALDI-TOF), 31P-ЯМР. Кандидатный иммуноадъювант в составе новой вакцины для профилактики и лечения туберкулеза в настоящий момент проходит стадию доклинических испытаний.

Эти молекулы представляют собой систему структурированных мицелл с возможностью введения различного рода синтетических модификаций, что позволит регулировать селективность и проникновение в ткани организма, обеспечить взаимодействие с поверхностными рецепторами, позволят заранее спроектировать схему полостей для депонирования молекул с возможным пролонгированным высвобождением *in vivo*, что будет также влиять на их иммуногенные свойства [3].

#### Литература.

- Исаенко Е.Ю., Бабич Е.М., Елисеева И.В. и др. Адъюванты в современной вакцинологии//Журнал института Мечникова. – 2013. - №4. – С. 5-21.
- Половинкина В.С., Марков Е.Ю. Структура и иммуноадъювантные свойства CpG ДНК//Медицинская иммунология. – 2010. – Т.12, №6. – С. 469-476.
- Яббаров Н.Г., Посыпанова Г.А., Воронцов Е.А. Мультифункциональные дендритные молекулы: перспективы применения в медицине и биологии//Молекулярная медицина. – 2012. - №6. – С. 37-45.
- Bode C., Zhao G., Steinhagen F. et al. CpG DNA as vaccine adjuvant// *Expert. Rev. Vaccines*. 2011. Vol. 10. №4. P. 499-511.
- Mifsud E., Tan A., Jackson D. TLR agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease//*Frontiers in immunology*. 2014. Vol. 5. Art. 79. P. 1-10.
- Morhi K., Kusuki E., Ohtsuki S., et al. Self-assembling DNA dendrimer for effective delivery of immunostimulatory CpG DNA to immune cells// *Biomacromolecules*. 2015. №16. P. 1095-1101.
- Savva A., Roger T. Targeting Toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases// *Frontiers in immunology*. 2013. Vol. 4. Art. 387. P. 1-17.
- Vollmer J., Krieg A. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists// *Advanced drug delivery reviews*. 2009. № 61. P. 195-204.

UDC 615.375

## CPG OLIGONUCLEOTIDES. DENDRIMERIC FORMS AS IMMUNOADJUVANTS IN VACCINES

**Smirnova A.S., Gudov V.P., Tkachuk A.P., Guschin V.A.**

*The Federal State Budgetary Institution "National Research Center for Epidemiology and Microbiology named by Honorable Academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation*  
 123098, Russia, Moscow, Gamaleya street, 18.  
 e-mail: goodofferman@gmail.com

Dendrimer molecules of CpG oligonucleotides with molecular weights is 18,671.2 g / mol and 55396.9 g / mol, were proposed analysis protocols using physical and chemical methods, the lyophilized form going the preclinical trials as immunoadjuvant in the vaccine composition.

**Key words:** vaccines, adjuvant, CpG DNA, Toll-like receptor.

Today in the fight against various infectious diseases, along with the creation of highly effective vaccines that cause a cascade of immune responses and persistent strained immunity, components that can strengthen this body reaction to the introduction of the vaccine are required [1].

CpG oligonucleotides it is fragments of a DNA molecule that contain unmethylated CpG motifs that provide a pronounced stimulating effect on the immune system [2, 4, 8]. Such molecules interact with the cellular receptors of Toll-like 9 [5, 7], causing a cascade of reactions with the production of anti-inflammatory cytokines and chemokines.

The study of the properties of already known forms of immunostimulating DNA and the development of new properties open up trends for the creation and introduction into medical practice of adjuvant vaccines and preparations. Currently, the vaccine for the prevention and treatment of tuberculosis, created in the Federal National Research Centre of Epidemiology and Microbiology and having in its composition as an adjuvant CpG oligonucleotide linear structure, completes IIa phase of the stage of clinical trials (safety and immunogenicity).

Considering the three-dimensional conformation and positioning of the Toll-like receptors that recognize foreign RNA and DNA, higher molecular weight structures were proposed that are dendrimers based on the linear structure of the CpG oligonucleotide [6]. In connection with this, dendrimer molecules of oligonucleotides were synthesized using special molecules (treblers) (Fig. 1), and isolation and purification were carried out, followed by analysis of properties and structure.

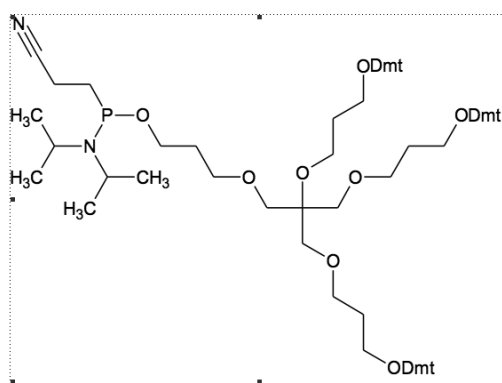


Fig. 1. The chemical structure of trebler.

Synthesis of the dendrimeric form of CpG oligonucleotides was carried out on the basis of linear oligonucleotide ODN 1826 by a solid phase phosphoramidite synthesis method. The basis of the internucleotide linkages of CpG ODN 1826 ( $M=6346,9$  g/mol, murine Toll-like 9 receptors) is phosphorothioate groups, which increase the lifetime of the oligonucleotides in vivo, which gives resistance to the action of cell nucleases. Dendrimer molecules were obtained as two candidate forms with molecular masse 18671,2 g/mol и 55396,9 g/mol accordingly (Fig. 2).

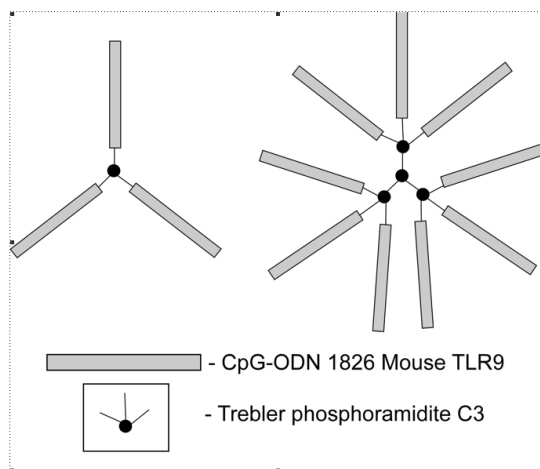


Fig. 2. Schematic structure dendrimers of two types of branching.

The structures was obtained and analyzed by methods such as HPLC, electrophoresis, mass-spectrometry (MALDI-TOF), 31P-NMR. This immunoadjuvant in the new vaccine for the prevention and treatment of tuberculosis is currently going preclinical trials.

These molecules are a system of structured micelles with the ability to introduce various kinds of synthetic

modifications that will allow to regulate the selectivity and penetration into the tissues of the organism, to interact with surface receptors, to allow the design of the depot's areas of molecules with possible prolonged release in vivo, which will also influence on their immunogenic properties [3].

#### References:

1. Isaenko E.U., Babich E.M., Eliseeva I.V. et al. Adjuvant in modern vaccinology // *Journal of the Mechnikov Institute*. 2013. №4. P. 5-21.
2. Polovinkina V.S., Markov E.U. Structure and immunoadjuvant properties of CpG DNA // *Medical Immunology*. 2010. Vol. 12. №6. P. 469-476.
3. Yabbarov N.G., Posipanova G.A., Vorontsov E.A. Multifunctional dendritic molecules: perspectives of application in medicine and biology // *Molecular medicine*. 2012. №6. P. 37-45.
4. Bode C., Zhao G., Steinhagen F. et al. CpG DNA as vaccine adjuvant // *Expert. Rev. Vaccines*. 2011. Vol. 10. №4. P. 499-511.
5. Mifsud E., Tan A., Jackson D. TLR agonists as modulators of the innate immune response and their potential as agents against infectious disease // *Frontiers in immunology*. 2014. Vol. 5. Art. 79. P. 1-10.
6. Morhi K., Kusuki E., Ohtsuki S., et al. Self-assembling DNA dendrimer for effective delivery of immunostimulatory CpG DNA to immune cells // *Biomacromolecules*. 2015. №16. P. 1095-1101.
7. Savva A., Roger T. Targeting Toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases // *Frontiers in immunology*. 2013. Vol. 4. Art. 387. P. 1-17.
8. Vollmer J., Krieg A. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists // *Advanced drug delivery reviews*. 2009. № 61. P. 195-204.

УДК 571.27

## АКТИВАЦИЯ CD39+FOXP3+ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Чуров А. В., Бабалык А. В.

Институт биологии - обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра "Карельский научный центр Российской академии наук" (ИБ КарНЦ РАН), Петрозаводск, Россия  
 e-mail: achurou@yandex.ru

Получены данные о численности субпопуляции FOXP3+ Treg-клеток при колоректальном раке. Отмечено увеличение активности Treg-клеток в онкогенезе.

**Ключевые слова:** Treg-клетки, FOXP3, колоректальный рак

Изучение патогенеза колоректального рака (КРР), сопровождаемого возникновением эпителиальных неоплазий толстой и прямой кишки, продемонстрировало его тесную связь с состоянием клеточного иммунитета, в том числе с изменением активности субпопуляции регуляторных CD4+ Т-клеток (Treg) (Жулай Г.А., 2016; Жулай Г.А, 2017). Целью данной работы было проведение исследований, направленных на оценку активности субпопуляции FOXP3+ Treg-клеток, экспрессирующих маркер CD39 (эктонуклеотидаза, ENTPD1). В работе исследовано 30 образцов периферической крови больных КРР (63,0±17,9 лет), а также 20 образцов крови здоровых доноров (55,2±18,1 лет). Диагноз КРР и стадия устанавливались комплексно согласно классификации TNM на основании морфологических, клинических, эндоскопических и лабораторных методов исследования. Забор проб проводился в стерильные вакуумные пробирки (GreenVac-Tube, Южная Корея) из локтевой вены (натощак). У опытной группы отбор и анализ крови проводился при первичном обследовании до начала терапии. Анализ содержания Treg-клеток выполнялся методом проточной цитометрии на приборе FC500 с использованием программного обеспечения CXP 2.0 (Beckman Coulter, США) и моноклональных антител к маркерам CD4, CD25, CD127 (Beckman Coulter, США), FOXP3 (eBioscience, США) и CD39 (BeckmanCoulter, США). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ GraphPad Prism 7.0. Для расчета достоверности различий между группами использовался критерий Манна-Уитни (p<0,05). Исследование выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования КарНЦ РАН.

По результатам оценки численности субпопуляции FOXP3+ Treg-клеток, было отмечено увеличение уровня эктонуклеотидазы CD39 у больных КРР. Так, уровень экспрессии CD39 на FOXP3+ Treg-клетках в периферической крови больных КРР был на 30% выше, чем в контроле. Анализ количества CD39+ клеток у больных КРР при развитии заболевания показал, что происходит накопление данной группы клеток на

III и IV стадиях опухолевого роста по сравнению со стадиями I и II ( $68,3 \pm 7,6\%$  и  $41,9 \pm 9,3\%$ , соответственно).

Эктонуклеотидаза CD39 является одним из ключевых регуляторов механизмов супрессии при онкогенезе. В работе продемонстрировано увеличение количества CD39+ Трег-клеток в периферической крови больных КРР, что отражает усиленную функциональную активность данных клеток.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-10182).

Литература:

1. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., Романов А.А., Кравченко П.Н., Олейник В.М. Роль Трег-клеток в аденозин-опосредованной иммунной супрессии при колоректальном раке // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – № 1. – С. 89-94.
2. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Романов А.А., Олейник В.М., Чуров А.В., Кравченко П.Н. Циркулирующие регуляторные Т-клетки и изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у больных колоректальным раком // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62. – № 1. – С. 96-100.

UDC 571.27

## ACTIVATION OF CD39+FOXP3+ REGULATORY T-CELLS IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

**Churov A. V., Babalyk A. V.**

*Institute of biology - division of Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (IB KarRC RAS),  
Petrozavodsk, Russian Federation  
e-mail: achurov@yandex.ru*

Here we report the data on the frequencies of the FOXP3+ Treg cells in peripheral blood samples of patients with colorectal cancer. We notice the increase in the activity of Treg cells in oncogenesis.

**Key words:** Treg-cells, FOXP3, colorectal cancer

The study of the pathogenesis of colorectal cancer (CRC), accompanied by the appearance of epithelial neoplasia of the colon and rectum, demonstrated its close connection with the cellular immunity, including changes in the activity of subpopulation of regulatory CD4+ T cells (Treg) (Zhulai G.A., 2016; Zhulai G.A., 2017). The aim of this study was to assess the activity of FOXP3+ Treg cell subpopulation that express CD39 surface marker (ectonucleotidase ENTPD1). Thirty peripheral blood samples of CRC patients ( $63,0 \pm 17,9$  years) and 20 blood samples of healthy donors ( $55,2 \pm 18,1$  years) were analyzed in the study. The diagnosis of CRC and the stage were established in complex according to TNM classification, based on morphological, clinical, endoscopic and laboratory methods. Blood samples were collected in sterile vacuum tubes (GreenVac-Tube, South Korea) from ulnar vein. The analysis of patient's blood samples was carried out prior to therapy. Treg cells numbers were analyzed FC500 flow cytometer using CXP 2.0 software (Beckman Coulter, USA) and monoclonal antibodies CD4, CD25, CD127 (Beckman Coulter, USA), FOXP3-PE (eBioscience, USA), CD39-PE (Beckman Coulter, USA). Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 7.0. Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ) was used to calculate the reliability of differences between groups. The research was carried out using the equipment of the Core Facility of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences.

Based on the results of the abundance of the FOXP3+ Treg cell subpopulation, we detected an increase in the expression level of ectonucleotidase CD39 in samples of CRC patients. The expression level of CD39 on FOXP3+ Treg cells in the peripheral blood of CRC patients was 30% higher than in control. The analysis of CD39+ cells number in patients with CRC during the development of the disease showed that this group of cells accumulates at the III and IV stages of tumor growth in comparison with stages I and II ( $68.3 \pm 7.6\%$  and  $41.9 \pm 9.3\%$ , respectively).

Ectonucleotidase CD39 is one of the key regulators of suppression mechanisms in oncogenesis. In the current study, an increase in CD39+ Treg cell numbers in the peripheral blood of CRC patients was demonstrated, which reflects the enhanced functional activity of these cells.

The reported study was supported by Russian Science Foundation (Project № 17-75-10182).

References:

1. Zhulai G.A., Oleinik E.K., Churov A.V., Romanov A.A., Kravchenko P.N., Oleinik V.M. Significance of Treg cells for adenosine-mediated immune suppression in colorectal cancer // Meditsinskaya Immunologiya. – 2017. – Vol. 19. – № 1. – P. 89-94.
2. Zhulai G.A., Oleinik E.K., Romanov A.A., Churov A.V., Kravchenko P.N. Circulating regulatory T-cells and changes in the subpopulation composition of lymphocytes in colorectal cancer patients // Voprosi onkolodii. – 2016. – Vol. 62. – № 1. – P. 96-100.

УДК 606:61

## АФФИНОСТЬ С ОЛИГОМЕРНЫМ ШАПЕРОНОМ GROEL КАК ПОКАЗАТЕЛЬ КОНФОРМАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Цукур А.А., Ломкова Е.А., Топкова О.В.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ,  
 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14, Российская Федерация  
 E-mail: tsukur@biocad.ru

При разработке лекарственных средств на основе белков одной из важнейших задач является сохранение физико-химических и биологических свойств терапевтической молекулы. Конформационная стабильность моноклональных антител может быть оценена по аффинности с олигомерным шапероном GroEL.

**Ключевые слова:** белки, моноклональные антитела, стабильность, конформационная стабильность, аффинность, олигомерный шаперон GroEL.

Под конформационной стабильностью белка понимают его способность сохранять свою конформацию, то есть расположение полипептидной цепи в пространстве, при хранении или стрессировании. Принято считать, что в водной среде гидрофобные аминокислоты скрываются внутрь белковой глобулы, снижая свободную энергию и обеспечивая лучшую растворимость молекулы. Потеря нативной конформации может приводить к образованию агрегатов и снижению биологической активности. Такой процесс называют анфолдингом, разворачиванием или денатурацией.

Конформационную стабильность возможно оценивать по аффинности исследуемого образца с олигомерным шапероном GroEL. Шаперон GroEL имеет сродство к гидрофобным сайтам белковых молекул и действует как кинетическая ловушка, закрепленная на специальном биосенсоре. Анализ аффинности проводят методом бислойной интерферометрии, который является количественным. Описанный метод позволяет определять содержание развернутых молекул белка в растворе до и после стрессирования, например, нагревания или шейкирования. Типичная сенсограмма бислойной интерферометрии при определении аффинности представлена на Рисунке 1.

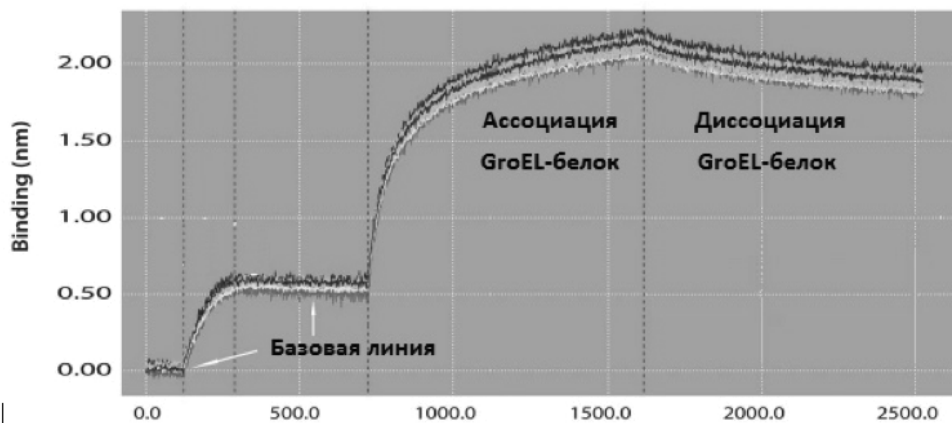


Рисунок 1. Типичная сенсограмма ассоциации и диссоциации белка при определении аффинности.

Метод определения аффинности с олигомерным шапероном GroE может быть эффективно применен при оценке конформационной стабильности моноклональных антител на стадиях выбора кандидатов терапевтических белков или разработки состава вспомогательных веществ.

Литература:

1. Lea, W.A. Chaperonin-Based Bilayer Interferometry to Assess the Kinetic Stability of Metastable, Aggregation-Prone Proteins / W.A. Lea, N. Subhashchandra, A.J. Machen // *Biochemistry*. – 2016. – 55(35). – P. 4885-4908.
2. Subhashchandra, N. Probing structurally altered and aggregated states of therapeutically relevant proteins using GroEL coupled to bio-layer interferometry / N. Subhashchandra, O.S Kumru, M. Cullom // *The Protein Society*. – 2014. – 23. – P. 1461-1478.

UDC 606:61

## AFFINITY WITH OLIGOMERIC CHAPERONE GROEL AS AN INDICATOR OF CONFORMATIONAL STABILITY OF MONOCLONAL ANTIBODIES

Tsukur A.A., Lomkova A.A., Topkova O.V.

FSEI of HE "Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy" Russian Federation Ministry of Health  
197376, St. Petersburg, street Prof. Popov, building 14,  
E-mail: tsukur@biocad.ru

In the development of medicines based on proteins one of the most important challenges is the preservation of the physico-chemical and biological properties of the therapeutic molecules. Conformational stability of monoclonal antibodies can be estimated by using affinity with oligomeric chaperone GroEL.

**Key words:** proteins, monoclonal antibodies, stability, conformational stability, affinity, oligomeric chaperone GroEL.

The conformational stability of a protein is understood as its ability to keep its conformation, that is, the organization of the polypeptide chain in space, during storage or stress. It is generally believed that in aqueous media, hydrophobic amino acids hide inside the protein globule, reducing free energy and providing better solubility of the molecule. Loss of native conformation can lead to the formation of aggregates and a decrease in biological activity. Such a process is called an unfolding or denaturation.

Conformational stability is possible to be estimated as the affinity of the investigated sample with the oligomeric chaperone GroEL. Chaperone GroEL has an affinity with the hydrophobic sites of protein molecules and acts as a kinetic trap, mounted on a special biosensor. Affinity analysis is carried out by bilayer interferometry, which is quantitative. The described method allows to determine the content of the expanded protein molecules in solution before and after stress, for example, heating or shaking. Typical sensogram of bilayer interferometry in determining the affinity is presented in Figure 1.

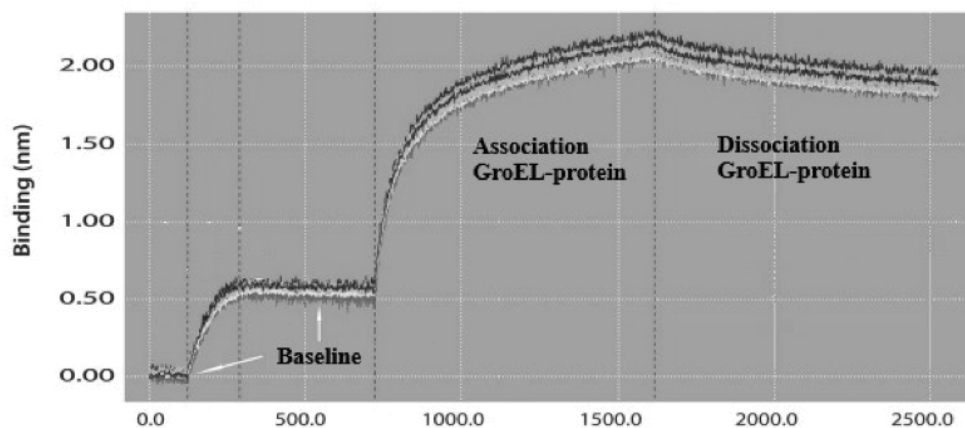


Figure 1. Typical sensogram of association and dissociation of protein in determining the affinity.

The method of affinity assessment with oligomeric chaperone GroEL can be effectively used in the evaluation of conformational stability of monoclonal antibodies at the stages of selection of candidates of therapeutic proteins or formulation development.

### References:

1. Lea, W.A. Chaperonin-Based Biolayer Interferometry to Assess the Kinetic Stability of Metastable, Aggregation-Prone Proteins / W.A. Lea, N. Subhashchandra, A.J. Machen // *Biochemistry*. – 2016. – 55(35). – P. 4885-4908.
2. Subhashchandra, N. Probing structurally altered and aggregated states of therapeutically relevant proteins using GroEL coupled to bio-layer interferometry / N. Subhashchandra, O.S Kumru, M. Cullom // *The Protein Society*. – 2014. – 23. – P. 1461-1478.



УДК 621.039.75

## БЕСКОНТАКТНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ ПО ВЫДЫХАЕМОМУ ВОЗДУХУ

Ю.М.Шляпников<sup>1</sup>, А.Ю.Михеев<sup>1</sup>, А.А.Николаев<sup>2</sup>, Е.А.Шляпникова<sup>1</sup>, Т.Р.Багдасарьян<sup>2</sup>, И.А.Бурмистрова<sup>2</sup>, Т.Г.Смирнова<sup>2</sup>, И.Ю.Андриевская<sup>2</sup>, Е.Е.Ларионова<sup>2</sup>, И.В.Лядова<sup>2</sup>, В.Н.Морозов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Россия, 142290, Пущино, Институтская, 3, [ribboni@yandex.ru](mailto:ribboni@yandex.ru), +79168822279

<sup>2</sup> ФГБНУ ЦНИИТ, Россия, 107564, Москва, Яузская аллея, 2, [ribboni@yandex.ru](mailto:ribboni@yandex.ru), +79168822279

Предложен новый способ неинвазивной диагностики туберкулёза лёгких, основанный на ультрачувствительном иммунохимическом анализе биомаркеров туберкулёза в выдыхаемых микрокаплях лёгочной жидкости, собираемых на наночипах.

**Ключевые слова:** туберкулёз, ультрачувствительный иммуноанализ, микрочип

Обнаружение на ранних стадиях активной формы туберкулеза до появления типичных признаков заболевания является чрезвычайно важной задачей. Мы представляем пионерское исследование, направленное на разработку неинвазивной диагностики туберкулёза легких, которое впервые основано на анализе биомаркеров туберкулеза в выдыхаемых микрокаплях лёгочной жидкости. Образцы выдыхаемого воздуха больных лёгочной формой туберкулёза собирали с помощью недавно разработанных авторами [1] нейлоновых наночипов, обеззараживали и тестировали на наличие клеток *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), ДНК Mtb и белковых биомаркеров - общего иммуноглобулина А, антигенов MtbPst-1 и ESAT-6, а также иммуноглобулина А, специфичного к этим антигенам. В образцах выдыхаемого воздуха больных туберкулёзом не были обнаружены ни клетки Mtb (предел детектирования LOD = 1 клетка), ни ДНК Mtb (LOD ~ 10 геномов). Обнаружение белковых биомаркеров проводили с помощью разработанного и апробированного в нашей лаборатории ультрачувствительного мультиплексного иммуноанализа на микрочипах, изготовленных авторами [2]. Показано, что чувствительность используемого метода составляет 1000-10000 молекул аналита [2]. В данной работе были проанализированы образцы, полученные от 42 больных и 13 здоровых добровольцев, и собранные при дыхании в течение 10 мин. Показано, что в 32 пробах больных и в 12 пробах здоровых добровольцев содержится иммуноглобулин А в количестве, превышающем 40 фг.

Имуноглобулин А, специфичный к ESAT-6, обнаружен в 14 из 32 проб, а специфичный к Pst-1 - в 23 образцах. IgA, специфичный к, по крайней мере, одному из антигенов, обнаружен в 24 образцах. Из 12 проб от здоровых добровольцев ESAT-6-специфичный или Pst-1-специфичный иммуноглобулины были обнаружены в 5 образцах.

Таким образом, чувствительность диагностики активной формы туберкулёза лёгких на основе присутствия, по меньшей мере, одного Mtb-специфического антитела составляет  $24/32 = 75\%$ , а специфичность -  $(12-5)/12 = 58\%$ . Полученные результаты показывают, что при использовании данного ультрачувствительного метода анализа выявляются не только больные туберкулёзом, но и потенциальные его носители. Таким образом, данное исследование открывает путь к новому способу неинвазивной диагностики инфекции легких.

### Литература:

1. Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Avseenko A.V., Morozov V.N. *Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6*//Eur. Pol. J. 2016.Vol.75. P.317–328.
2. Shlyapnikov Y.M., Morozov V.N. *Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels*//Anal. Chim. Acta.2017.Vol.966.P.47-53.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-15-00086.

UDC 621.039.75

## NON-INVASIVE DIAGNOSTICS FOR PULMONARY TUBERCULOSIS USING EXHALED AIR

Y.Shlyapnikov <sup>1</sup>, A.Mikheev <sup>1</sup>, A.Nikolaev <sup>2</sup>, E.Shlyapnikova <sup>2</sup>, T.Bagdasaryan <sup>2</sup>, Burmistrova <sup>2</sup>, T.Smirnova <sup>2</sup>, I.Andrievskaya <sup>2</sup>, E.Larionova <sup>2</sup>, I.Lyadova <sup>2</sup>, V.Morozov <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Russia, 142290, Pushchino, Institutskaya, 3

<sup>2</sup> Central Tuberculosis Research Institute, узская аллея, 107564, Moscow, Yauzskaya alleia, 2

A new method for noninvasive diagnosis of pulmonary tuberculosis is proposed, based on an ultrasensitive immunochemical analysis of tuberculosis biomarkers in exhaled microdroplets of pulmonary fluid collected on nanofilters.

**Key words:** tuberculosis, ultrasensitive immunoassay, microarray

Early detection of active tuberculosis (TB) before typical signs of infection appear is an extremely important task. In this report we present a proof-of-principle study aimed at developing non-invasive diagnostics for pulmonary TB that are based on analyzing TB biomarkers in exhaled microdroplets of lung fluid (MLFs). Samples were collected on electrospun filters recently developed by the authors[1], and then tested for the presence of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) cells, Mtb DNA, and protein biomarkers (secreted Mtb antigens and antigen-specific antibodies). Neither Mtb cells (limit of detection, LOD = 1 cell) nor Mtb DNA (LOD ~ 10 CFU) were found in the MLF samples exhaled by TB patients.

The protein biomarkers were evaluated using an ultra-sensitive electrophoretically enhanced multiplexed immunoassay on antibody microarrays developed by the authors[2]. MLF samples were collected from a total of 42 patients and 13 healthy volunteers. We demonstrated for the first time that MLF samples collected for 10 min from most TB patients (38 of 42) contained IgA above LOD ~ 1 fg, and in 32 samples the level of IgA was high enough (> 40 fg) to enable detection of IgA specific to PstS-1 or/and ESAT-6, the two antigens secreted by Mtb. With the cut-off for positive results set above 1 fg, anti-ESAT-6 antibodies were detected in 14 of these 32 samples; anti-PstS-1 antibodies were found in 23 samples; and at least one of these was found in 24 samples. In healthy volunteers, identifiable amounts of total IgA were detected in samples taken from 12 of 13 volunteers. Of these 12 samples, ESAT-6-specific antibodies were detected in only 3 samples, and anti-PstS1 antibodies and antibodies specific to any of those in 5 samples.

Thus, the sensitivity and the specificity of the analysis for active TB based on the presence of at least one Mtb-specific antibody were estimated as 75% and 58%, respectively. The obtained results show that using this ultra-sensitive method of analysis reveals not only patients with tuberculosis, but also its potential carriers. This study opens an avenue to a non-invasive diagnostic for lung TB infection.

### References:

1. Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Avseenko A.V., Morozov V.N. Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6//Eur. Pol. J.2016.Vol.75. P:317–328.
2. Shlyapnikov Y.M., Morozov V.N. Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels//Anal. Chim. Acta. 2017.Vol.966.P:47-53.

**Grant:** The authors acknowledge funding from the Russian Science Foundation (Grant No. 15-15-00086).

УДК 577.112.083

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АЛЛЕРГЕНОВ FRA A 1 И FRA A 3 ИЗ КЛУБНИКИ FRAGARIA ANANASSA

Зазыкина А.Д., Мельникова Д.Н., Богданов И.В., Овчинникова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, (ИБХ РАН), Москва, Россия  
 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
 e-mail: d\_n\_m@mail.ru

Разработан биотехнологический способ получения, выделения и очистки клинически значимых рекомбинантных аллергенов из клубники Fra a 1 и Fra a 3. Подтверждены аллергенные свойства рекомбинантных Fra a 1 и Fra a 3. Исследована устойчивость структур Fra a 1 и Fra a 3 к действию протеолитических ферментов. Исследована РНКазная активность полученных рекомбинантных белков.

**Ключевые слова:** аллергены, растительные липид-транспортирующие белки, гомологи Bet v 1, рибонуклеазная активность.

Многие растительные белки, вызывающие аллергические реакции, относятся к гомологам пыльцевого аллергена березы Bet v 1 и липид-транспортирующим белкам. Аллергенные свойства данных белков обусловлены наличием эпитопов и достаточно устойчивой структурой. Некоторые липид-транспортирующие белки и гомологи пыльцевого аллергена березы Bet v 1 используются для компонентной диагностики аллергии и рассматриваются в качестве перспективных препаратов для проведения превентивной аллерген-специфичной иммунотерапии (АСИТ). Исследование свойств и механизмов действия данных белков расширит наши представления об их влиянии на иммунную систему человека и создаст предпосылки для возможного применения в медицине.

Для проведения структурно-функциональных исследований были выбраны два аллергена клубники *Fragaria ananassa*: представитель LTP Fra a 3 и гомолог Bet v 1 Fra a 1. Были разработаны системы для гетерологической экспрессии данных аллергенов в клетках *E. coli* в виде гибридных конструкций с тиоредоксином А и октагистидиновой последовательностью. Сконструированные плазмидные векторы обеспечили последующее расщепление рекомбинантных гибридных белков фактором Ха в случае Fra a 1 и бромцианом в случае Fra a 3. Очистка целевых рекомбинантных аллергенов была проведена с использованием аффинной хроматографии и ОФ ВЭЖХ. Разработанная методика выделения аллергенов позволила получить их рекомбинантные аналоги, полностью идентичные природным белкам по молекулярной массе, N-концевой аминокислотной последовательности и спектру кругового дихроизма. Исследование аллергенных свойств Fra a 1 и Fra a 3 методом иммуноферментного анализа с использованием сывороток пациентов с пищевой и пыльцевой аллергией выявило высокую IgE-опосредованную реактивность пациентов к Fra a 1. Исследование устойчивости аллергенов клубники Fra a 1 и Fra a 3 к действию протеолитических ферментов показало, что структура молекулы Fra a 3 не подвергается действию протеаз, в то время как Fra a 1 под действием пепсина расщепляется на несколько фрагментов, один из которых стабилен при действии данного фермента. Установленная методом микросеквенирования по Эдману N-концевая аминокислотная последовательность устойчивого фрагмента Fra a 1 имеет высокую степень гомологии с фрагментом пыльцевого аллергена березы Bet v 1, содержащим три линейных IgE-связывающих эпитопа. Предположительно, эти эпитопы участвуют в развитии аллергических реакций на пыльцу и растительные продукты питания. Исследования по изучению рибонуклеазной активности Fra a 1 и Fra a 3 показали, что оба белка могут осуществлять деградацию РНК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

UDC 577.112.083

## BIOTECHNOLOGICAL METHOD FOR PRODUCTION AND INVESTIGATION OF PROPERTIES OF ALLERGENS FRA A 1 AND FRA A 3 FROM STRAWBERRY FRAGARIA ANANASSA

Zazykina A.D., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Ovchinnikova T.V.

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
117997, Moscow, Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10,  
e-mail: d\_n\_m\_@mail.ru*

Biotechnological methods for production of clinically relevant allergens from strawberry Fra a 1 and Fra a 3 were developed. Allergenic features of recombinant Fra a 1 and Fra a 3 were proved. The stability of Fra a 1 and Fra a 3 structures to the action of proteolytic enzymes was explored. The RNase activity of recombinant proteins was investigated.

**Key words:** allergens, plant lipid transfer protein, Bet v 1 homologue, ribonuclease activity.

Many plant allergens that cause severe allergic reactions belong to the homologues of pollen allergen Bet v 1 and lipid transfer proteins. The allergenic properties of these proteins are due to the presence of epitopes and a fairly stable structure. Many lipid transfer proteins and homologues of the pollen allergen Bet v 1 are used for component diagnostics of allergy and are widely studied as promising drugs for conducting preventative allergen-specific immunotherapy (ASIT). The study of these proteins properties and the mechanisms of their action will expand our understanding of their effect on the human immune system and create the prerequisites for possible application in medicine.

For structural and functional studies two allergens of strawberry were selected: the representative of LTPs – Fra a 3 and the Bet v 1 homologues – Fra a 1. Heterologous expression systems for production of these allergens in *E. coli* BL21(DE3) cells were constructed. The target allergens were overexpressed as fusion proteins contained N-terminal 8His-tag and thioredoxin A. Constructed plasmid vectors provided a sequential purification procedure with Xa factor in case of Fra a 1 and with CNBr in case of Fra a 3. Purification of the recombinant allergens involved immobilized metal-chelate affinity chromatography (IMAC) with subsequent Xa factor or CNBr cleavage of the fusion proteins, repeated IMAC and final reversed-phase HPLC. The developed biotechnological methods allowed to prepare the allergens recombinant analogues identical to the natural proteins by molecular weight, amino acid sequence and spectra of circular dichroism. The investigation of allergenic features of recombinant Fra a 1 and Fra a 3 by the ELISA method with use of sera of patients with food and pollen allergy revealed a high IgE-dependent reactivity of patients to Fra a 1. Investigation of the stability of allergens Fra a 1 and Fra a 3 against the action of proteolytic enzymes showed that the structure of Fra a 3 is not exposed to proteases, while Fra a 1 under the action of pepsin splits into several fragments, one of which is stable under the action of this enzyme. The N-terminal amino acid sequence of the stable fragment Fra a 1, established by the automatic Edman microsequencing method, has a high degree of homology with the fragment of Bet v 1 allergen containing three linear IgE-binding epitopes. Presumably, these epitopes are involved in the development of allergic reactions to pollen and plant foods. The research of the ribonuclease activity of Fra a 1 and Fra a 3 showed that both proteins can perform RNA degradation.

The work was supported by the Russian Science Foundation (agreement No. 14-50-00131).

УДК 577.112.083

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА ГЛАВНОГО АЛЛЕРГЕНА AMB A 1 АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA

Романова Т.В., Мельникова Д.Н., Богданов И.В., Овчинникова Т.В.

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России) Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), Москва, Россия  
 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
 e-mail: d\_n\_m@mail.ru

Разработан биотехнологический способ получения и очистки рекомбинантного клинически значимого аллергена Amb a 1 амброзии полыннолистной. Методами электрофореза в ПААГ, автоматического N-концевого секвенирования по Эдману и масс-спектрометрии МАЛДИ была подтверждена идентичность рекомбинантного Amb a 1 природному аллергену.

**Ключевые слова:** аллерген; гетерологичная экспрессия; пектатлиазы

Аллергия на пыльцу является одним из самых распространенных аллергических заболеваний и может послужить причиной крапивницы, отеков Квинке, бронхиальной астмы. Применение индивидуальных природных и рекомбинантных аллергенов, содержащихся в растительных организмах, повышает надежность диагностики и безопасность лечения аллергии. Целью данной работы являлась разработка биоинженерных подходов к созданию высокоэффективных продуцентов рекомбинантного аналога клинически значимого аллергена Amb a 1 амброзии полыннолистной *Ambrosia artemisiifolia*, пыльца которой является одной из основных причин поллиноза.

Разработаны системы для гетерологической экспрессии в *E.coli* главного аллергена Amb a 1, относящегося к классу пектатлиаз. Рекомбинантный Amb a 1 экспрессировался под контролем промотора T7 в клетках штамма BL-21(DE3), несущего ген T7 РНК-полимеразы. N-Концевой октагистидиновый участок обеспечивал возможность выделения белка методом аффинной хроматографии. Один из сконструированных вариантов рекомбинантных плазмид предусматривал получение Amb a 1 в форме гибридного белка с тиоредоксином А. Для последующей очистки рекомбинантного Amb a 1 в область между тиоредоксином А и целевым белком был введен сайт расщепления полипептидной цепи - тетрапептид IDGR, позволяющий проводить расщепление фактором Ха. Для предотвращения протеолиза Amb a 1 во время выделения и очистки методом сайт-направленного мутагенеза остаток Lys180 в структуре белка был заменен на остаток Ala180. Рекомбинантный Amb a 1 был охарактеризован методами электрофореза в ПААГ, масс-спектрометрии МАЛДИ и автоматического N-концевого секвенирования по методу Эдмана.

UDC 577.112.083

## BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF THE MAJOR ALLERGEN AMB A 1 OF THE COMMON RAGWEED AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA

Romanova T.V., Melnikova D.N., Bogdanov I.V., Ovchinnikova T.V.

M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow  
 117997, Moscow, Ul. Miklukho-Maklaya, 16/10  
 e-mail: d\_n\_m@mail.ru

The method for biotechnological production of the clinically relevant allergen Amb a 1 of the common ragweed *Ambrosia artemisiifolia*, was developed. Identity of the obtained recombinant analogue to the natural protein was estimated by SDS-PAGE, MALDI-TOF mass spectrometry, N-terminal protein sequencing.

**Key words:** allergen; heterologous expression; pectate lyases

Allergy to pollen is one of the most common allergic diseases which can cause urticaria, Quinck edema, bronchial asthma. The use of individual natural and recombinant allergens, increases the reliability of diagnosis and the safety

of allergy treatment. The aim of this work was to develop bioengineering approach to the design of highly efficient producers of the recombinant analogue of the clinically significant allergen of the common ragweed *Ambrosia artemisiifolia* which is one of the main causes of pollinosis.

The system for heterologous expression of major allergen Amb a 1 in *E. coli* was developed. The recombinant Amb a 1 was expressed under the control of the T7 promoter in cells of the *E. coli* strain BL-21(DE3), carrying the gene for T7 RNA polymerase. The N-terminal octahistidine tag provides isolation of the protein by immobilized metal affinity chromatography (IMAC). One of the constructed plasmids allows to express Amb a 1 as a hybrid protein with thioredoxin A. In order to perform a sequential purification procedure, the cleavage site was introduced into the polypeptide chain between thioredoxin A and target protein - tetrapeptide IDGR, allowing to carry out the cleavage with Xa factor. A mutant form of Amb a 1 was obtained. To prevent proteolysis of Amb a 1 during isolation and purification of the protein, the Lys180 residue was replaced by the Ala180 residue by site-directed mutagenesis. The recombinant Amb a 1 was characterized by SDS-PAGE, MALDI mass spectrometry, and automatic N-terminal sequencing.

## ВЫЯВЛЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО АНТИГЕНА МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА С ГКР-ДЕТЕКЦИЕЙ СИГНАЛА

Кудряшова А.М. <sup>1</sup>, Галстян А.Г. <sup>1</sup>, Файзулов Е.Б. <sup>1</sup>, Оленин А.Ю. <sup>2</sup>, Лисичкин Г.В. <sup>2</sup>, Зверев В.В. <sup>1</sup>, Борисова О.В. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет  
115088, Москва 1-я Дубровская улица, д. 15.

E-mail: 2238250@rambler.ru;

Показана возможность выявления аденовируса в сложных биологических образцах с использованием окисленной формы ТМБ в качестве ГКР-репортера и наночастиц серебра как ГКР-субстрата.

**Ключевые слова:** аденовирус, твердофазный ИФА, гигантское комбинационное рассеяние, 3,3',5,5'- тетраметилбензидин, наночастицы серебра.

Изучалась возможность выявления антигена аденовируса с детекцией спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) окисленной формы 3,3',5,5'- тетраметилбензидина (ТМБ+) как продукта иммуноферментной реакции [1,2].

Материалы и методы. Использовали клинические фекальные образцы, содержащие аденовирусы, ротавирусы группы А, норовирусы и образцы здоровых детей, а также лабораторные штаммы аденовирусов с титром 5-6 Ig ТЦД50/мл. Иммуноферментный анализ проводился в сэндвич-формате, антиген аденовируса сначала связывался со специфическими антителами на твердой фазе, а затем с антителами, меченными пероксидазой. Результаты ферментативной реакции пероксидазы с перекисью водорода в присутствии 3,3',5,5'- тетраметилбензидина оценивались фотометрически или путем измерения ГКР-спектров после внесения в реакционную смесь наночастиц серебра. Регистрацию спектров проводили на спектрометре (ИнСпектр MIXSplitter, ООО «ИнСпектр», 532 нм.). В работе использовались наночастицы со средним размером 7,5 нм и  $\zeta$ -потенциалом  $-31 \pm 1$  мВ.

Результаты. Для оценки результатов детекции ГКР-спектров использовалась интенсивность пика при 1600 см<sup>-1</sup>. Была получена обратная зависимость, и уменьшение концентрации аденовируса приводило к увеличению интенсивности ГКР-сигналов. Рис. 1.

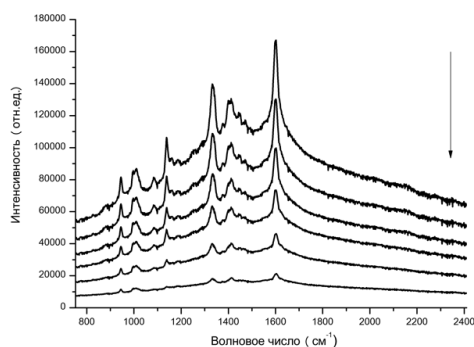


Рис.1. ГКР-спектры, полученные для возрастающих концентраций аденовируса. Направление стрелки указывает на увеличение содержания антигена аденовируса.

На основании исследования коллекции 35 отрицательных образцов было рассчитано пороговое значение. Была показана сходимость результатов определения аденовируса в фекальных образцах в сравнении с ИФА с фотометрической детекцией сигнала и методом ПЦР с коэффициентом вариации 10-12% при ГР-детекции и 7-8% для фотометрического метода.

Исследование было выполнено за счет средств гранта РФФ 16-15-10332.

Литература:

1. Liang J., Liu H., Huang C. et al. Aggregated Silver Nanoparticles Based Surface-Enhanced Raman Scattering Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Ultrasensitive Detection of Protein Biomarkers and Small Molecules. *Anal. Chem.* 2015, 87, 5790–5796.
2. Zhan L., Zhen S.J., Wan X.Y. et al. A sensitive surface-enhanced Raman scattering enzyme-catalyzed immunoassay of respiratory syncytial virus. *Talanta.* 2016, 148: 308–312.

## DETECTION OF ADENOVIRUS ANTIGEN BY A SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

Kudryashova A.M.<sup>1</sup>, Galstyan A.G.<sup>1</sup>, Faizuloev E.B.<sup>1</sup>, Olenin A.Yu.<sup>2</sup>, Lisichkin G.V.<sup>2</sup>, Zverev V.V.<sup>1</sup>, Borisova O.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Chemistry Department, Russia

The possibility of TMB+ using as a SERS reporter and silver nanoparticles as a SERS substrate for the detection of adenovirus antigen in complex biological samples was shown.

**Key words:** adenovirus, enzyme-linked immunosorbent assay, surface-enhanced Raman scattering, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, silver nanoparticles

The possibility of adenovirus antigen detection by recording of surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of enzyme oxidized product of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB+) was studied [1,2].

**Materials and methods.** Clinical fecal samples containing adenoviruses, group A rotaviruses, noroviruses and healthy children samples, as well as laboratory strains of adenoviruses with a titer of 5-6 lg TCD50/ml were used. Adenovirus antigen is first captured with specific antibody on a solid substrate and subsequently with an HRP-labeled antibody, forming sandwich complex. The results of the enzymatic reaction of peroxidase with hydrogen peroxide in the presence of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine were evaluated photometrically or the Raman spectra were recorded by a Raman spectrometer (InSpectrum MIXSplitter, InSpectrum Ltd., 532 nm) after incubation with silver nanoparticles. Nanoparticles with an average size of 7.5 nm and a  $\zeta$  potential of  $-31 \pm 1$  mV were used.

**Results.** To estimate the results of the detection the Raman peak intensity at 1600 cm<sup>-1</sup> was used. An inverse relationship was obtained, and a decrease in adenovirus concentration led to an increase in the intensity of the SERS signal. Fig. 1.

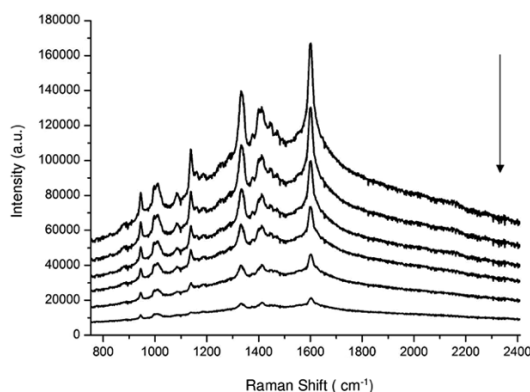


Рис.1. SERS spectra for increasing concentration of adenovirus. The direction of the arrow indicates an increase in the adenovirus antigen content.

The work was supported by the grant Russian Science Foundation 16-15-10332.

The cut-off value using a collection of 35 negative fecal samples was calculated. The concordance of the adenovirus detection results in fecal samples was obtained in comparison with the enzyme immunoassay method with colorimetric detection and PCR with the coefficient of variation of 10-12% for Raman detection and 7-8% for the photometric method.

*References:*

1. Liang J., Liu H., Huang C. et al. Aggregated Silver Nanoparticles Based Surface-Enhanced Raman Scattering Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Ultrasensitive Detection of Protein Biomarkers and Small Molecules. *Anal. Chem.* 2015, 87, 5790–5796.
2. Zhan L., Zhen S.J., Wan X.Y. et al. A sensitive surface-enhanced Raman scattering enzyme-catalyzed immunoassay of respiratory syncytial virus. *Talanta.* 2016, 148: 308–312.

УДК: 615.076.9, ББК: 52.82

## **ИЗУЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ ДИСПЕРСИИ ФУЛЛЕРЕНА C60**

**Е.А.Турецкий, С.М.Андреев, Н.Н.Шершакова, О.Ю.Камышников, Е.И.Кукс, В.В.Смирнов, М.Р.Хаитов**

ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, EA.Turetskiy@ncii.ru, 8(985)16-33-555

Хроническая токсичность водного раствора фуллерена C60 была оценена на самках мышей линии balb/c через месяц ежедневного внутрибрюшинного (в/б) введения. Результаты гистологического исследования и общего анализа крови не выявили патологических нарушений у мышей экспериментальной группы.

**Ключевые слова:** Фуллерен C60, хроническая токсичность, нанобиотехнологии.

Фуллерен C60 обладает рядом биологических активностей, которые делают его привлекательным терапевтическим агентом. Предыдущие исследования не выявили у фуллерена токсичности для млекопитающих, однако, из-за многочисленности факторов, влияющих на токсичность *in vivo* фуллереновых соединений, оценку острой и хронической токсичности требуется проводить для каждого нового соединения и способа получения препаратов на их основе[2].

Ранее, авторским коллективом был разработан способ получения стабильных водных дисперсий фуллерена C60, проведено изучение ряда его биологических активностей, а также оценка острой токсичности [3, 4]. Для оценки хронической токсичности водные дисперсии фуллерена C60 вводили самкам мышей линии balb/c (в/б) ежедневно в течение 30 дней в дозе 200мкг. Мышам контрольной группы вводили фосфатно-солевой буфер. В ходе исследования состояние мышей контролировали посредством осмотра и взвешивания. По окончании введения фуллерена состояние животных оценивали посредством проведения общего анализа крови и гистологического исследования, состоящего из макроскопического анализа и исследования микропрепаратов органов.

Анализ крови не выявил патологических изменений у экспериментальной группы, однако зафиксировал снижение содержания лейкоцитов по сравнению с контрольной группой. Гистологическое исследование сердца, тимуса, лёгких, печени, селезёнки, тонкого и толстого отдела кишечника, поджелудочной железы почек, надпочечников, матки, яичников и лимфатических узлов, в целом, не выявило в органах животных, получавших фуллерен C60, патоморфологических изменений.

Наибольший интерес представляют собой найденные в брыжейке желудка, селезёнки и тонкого кишечника на всём её протяжении, в малом и большом сальнике, а также в свободной жировой ткани брюшной полости и в паранефральной клетчатке образования, представляющие собой частично поглощённые макрофагами депозиты фуллерена C60.



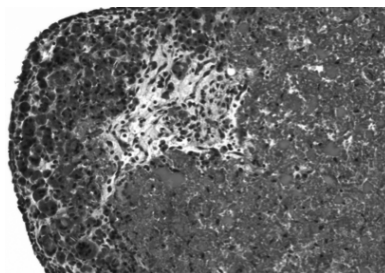


Рисунок 1: Гранулёмоподобное образование, состоящее из депозитов инородного вещества, расположенного внутри- и внеклеточно. Гематоксилин-эозин, увеличение в 200 раз.

В первую очередь, стоит отметить, что данные образования не вызывали каких-либо нарушений в прилегающих органах, т.е., не было выявлено компрессии близлежащих сосудов или самих органов. Не менее любопытно то, что в образованиях, не смотря на наличие разрушенных макрофагов, не обнаруживалось никаких признаков воспалительного процесса. Вероятнее всего, именно взаимодействие с тканевыми макрофагами и лежит в основе механизма противовоспалительного действия фуллерена C60, отмечаемого ранее в литературе[1].

Данное исследование позволило установить отсутствие хронической токсичности у водной дисперсии фуллерена C60, а также оценить некоторые аспекты механизма его противовоспалительной активности.

Данное исследование позволило установить отсутствие хронической токсичности у водной дисперсии фуллерена C60, а также оценить некоторые аспекты механизма его противовоспалительной активности.

#### Литература:

1. Ilinskaya A.N., Dobrovolskaia M.A. *Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of engineered nanomaterials* // *British Journal of Pharmacology*. 2014. Т. 171. № 17. 3988–4000 с. 2. LALWANI G., SITHARAMAN V. *MULTIFUNCTIONAL FULLERENE- AND METALLOFULLERENE-BASED NANOBIO MATERIALS* // *Nano LIFE*. 2013. № 3 (3). С. 1342003. 3. Шершакова Н.Н., Барабоскина Е.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Смирнов В.В., Камышников О.Ю., Хайтов М.Р. (2016) Отсутствие острой токсичности у водного раствора фуллерена C60, *Иммунология*. 37(6):325-329 4. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, Purgina D, Struchkova I, Kamyshnikov O, Nikonova A, Khaitov M (2016) Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *Journal of Nanobiotechnology* 14(1):1483-1493 DOI: 10.1186/s12951-016-0159-z (IF=4,12).

UDC: 615.076.9, ББК: 52.82

## STUDY OF SUB-ACUTE TOXICITY OF FULLERENE C60 AQUEOUS DISPERSION.

**E.Turetskiy, S.Andreev, N.Sherashakova, O.Kamyshnikov, E.Kuks, V.Smirnov, M.Khaitov**

*NRC Institute of immunology FMBA of Russia, Russia, 115478, Moscow, Kashira highway, 24*

Sub-acute toxicity of aqueous solution of fullerene C-60 was evaluated in female mice of balb/c line after a month of daily intraperitoneal (IP) injections. Results of histological study and complete blood count (CBC) did not indicate any pathological changes in mice of experimental groups.

**Key words:** Fullerene C60, sub-acute toxicity, nanobiotechnology.

Fullerene C60 has a variety of biological activities that make it a prominent therapeutic agent. Previous studies did not reveal fullerene toxicity in mammals, however due to a large number of factors, influencing in vitro toxicity of fullerene compounds, evaluating acute and sub-acute toxicity is required for every new compound and method of preparation [2].

Earlier author collective has developed a method of obtaining stable fullerene C60 aqueous dispersion and evaluated its biological activities and acute toxicity [3, 4]. To evaluate sub-acute toxicity fullerene C60 aqueous dispersions were injected into female balb/c mice (IP) daily for the duration of 30 days. During that period mice condition was controlled with observation and weighing of the animals. After this period, animals' condition was evaluated with CBC and histological study, which included macroscopic analysis and microscopic study of the organs.

CBC did not reveal pathological changes within mice of experimental group, but it showed a decrease in

leucocyte concentration in comparison to the control group. Histological study of heart, thymus, lungs, liver, spleen, small and large intestine, pancreas, kidneys, suprarenal glands, uterus, ovaries and lymphatic nodes of the animals receiving fullerene C60 did not uncover pathomorphological changes.

The most interesting findings concern granuloma-like formations, consisting of fullerene C60 deposits, partially consumed by macrophages, discovered in mesogaster, mesentery, greater and lesser omenti, adipose tissue and paranephric fat.

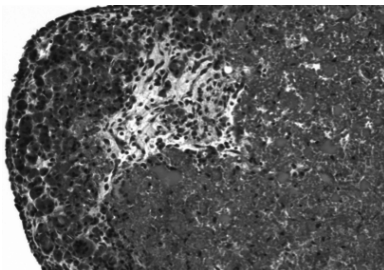


Figure 1: Granuloma-like formation, consisting of xenobiotic intra- and extra-cellular deposits. Haematoxylin and eosin, 200x.

It should be mentioned, that described formations did not have any adverse effects on the adjusted organs, i.e. no organ or vessel compression was registered. It is also curious, that even though destroyed macrophage were found in the formations, no signs of inflammation were seen. It is likely, that interactions with macrophage are underlying the mechanism of anti-inflammatory action of fullerene C60, described earlier in the literature [1].

This study has allowed to determine lack of sub-acute toxicity of fullerene C60 aqueous dispersion, as well as evaluate some aspects of mechanism of its anti-inflammatory action.

This study has allowed to determine lack of sub-acute toxicity of fullerene C60 aqueous dispersion, as well as evaluate some aspects of mechanism of its anti-inflammatory action.

#### References:

1. Ilinskaya A.N., Dobrovolskaia M.A. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of engineered nanomaterials // *British Journal of Pharmacology*. 2014. T. 171. № 17. 3988–4000 c.
2. LALWANI G., SITHARAMAN B. MULTIFUNCTIONAL FULLERENE- AND METALLOFULLERENE-BASED NANOBIONOMATERIALS // *Nano LIFE*. 2013. № 3 (3). C. 1342003.
3. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, Shabanova D, Smirnov V, Khaitov M (2016) Lack of acute toxicity of fullerene C60 aqueous solution, *Иммунология*. 37(6):325-329 (in russian)
4. Shershakova N, Baraboshkina E, Andreev S, Purgina D, Struchkova I, Kamyshnikov O, Nikonova A, Khaitov M (2016) Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *Journal of Nanobiotechnology* 14(1):1483-1493 DOI: 10.1186/s12951-016-0159-z (IF=4,12).

УДК 612.3:571.27:612.1:613.27

## ИММУННЫЙ СТАТУС КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО СНИЖЕНИЯ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ ЭССЕНЦИАЛЬНЫМИ НУТРИЕНТАМИ

Требух М.Д., Садыкова Э.О., Шестакова С.И., Тышко Н.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "ФИЦ питания и биотехнологии", Москва, Россия  
109240, Москва, Устьинский проезд, дом 2/14  
e-mail: trebukh@ion.ru

В статье представлены результаты исследования иммунного статуса крыс в условиях различных уровней обеспеченности витаминами группы В (В1, В2, В3, В6) и минеральными веществами (Fe<sup>3+</sup> и Mg<sup>2+</sup>).

**Ключевые слова:** крысы, иммунный статус, адаптационный потенциал, витаминно-минеральный состав рационов, гуморальный и клеточный иммунитет

Иммунный статус, являющийся одной из составляющих адаптационного потенциала организма, представляет значительный интерес при изучении объектов с неизвестной токсичностью, в частности, новых видов пищевой продукции. В рамках совершенствования методологии токсикологических исследований были разработана модель, основанная на использовании рационов со сниженным содержанием витаминов (В1, В2, В3, В6) и минеральных веществ (Fe<sup>3+</sup> и Mg<sup>2+</sup>), и обеспечивающая последовательное снижение адаптационного потенциала лабораторных животных. Эффективность данной модели была подтвержде-

на в экспериментах с солями кадмия ( $Cd^{2+}$ ) и этиловым спиртом, были выявлены закономерности усиления эффекта их токсического действия на фоне снижения обеспеченности эссенциальными веществами. В статье рассмотрена возможность применения модели снижения адаптационного потенциала при оценке иммунного статуса крыс.

Эксперимент длительностью 65 дней проводили на крысах линии Вистар с исходной массой тела 90-110 г, возраст крыс в начале эксперимента составлял 30 дней. Самцы и самки были разделены на 3 группы (по 30 самцов и 30 самок в каждой группе). Всего в эксперименте было использовано 180 животных. Крысы получали полусинтетический казеиновый рацион с оптимальной (75%) дозировкой эссенциальных веществ (витаминов В1, В2, В3, В6 и минеральных веществ –  $Fe^{3+}$  и  $Mg^{2+}$ ), с маргинальной (30% для самцов и 28% для самок) и субмаргинальной (19% для самцов и 18% для самок) дозировками эссенциальных веществ.

Показатели гуморального и клеточного звеньев иммунитета, такие как лейкоцитарный профиль, лизоцимная активность сыворотки крови, содержание иммуноглобулинов IgG, IgE, цитокиновый профиль сыворотки крови, масса органов иммунной системы, у самцов и самок всех групп не демонстрировали значимых различий, которые можно было бы связать с составом рационов.

Таким образом, снижение содержания витаминов группы В, железа и магния в рационе крыс не вызывает комплексных изменений иммунного статуса крыс. Предложенная модель снижения адаптационного потенциала не является оптимальной для изучения ответа иммунной системы. Вместе с тем проведенные масштабные исследования иммунного статуса крыс (изучено 18 показателей, выборка из 90 самцов и 90 самок) позволяют с определенной долей условности установить диапазон физиологических колебаний этих показателей у крыс линии Вистар соответствующего пола и возраста. Поскольку уровень интерлейкинов у крыс на таком объеме выборки был изучен впервые, полученные данные, вне всяких сомнений, уникальны и будут в дальнейшем использованы в экспериментальных исследованиях.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-16-00124.

UDC 612.3:571.27:612.1:613.27

## IMMUNE STATUS OF RATS UNDER CONDITIONS OF ESSENTIAL NUTRIENTS' GRADUAL DECLINE

Trebukh M.D., Sadykova E.O., Shestakova S.I., Tyshko N.V.

Federal State Institution of Science "Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety" Moscow, Russia 109240 Moscow, Ustinsky Proezd, 2/14  
 109240, Moscow, Ustinsky proezd 2/14  
 e-mail: trebukh @ion.ru

The publication presents the study results of male and female rats' immune status in conditions of different levels of vitamins (B1, B2, B3, B6) and minerals ( $Fe^{3+}$  and  $Mg^{2+}$ ) intake.

**Key words:** rats, immune status, adaptive potential, diet's vitamin and mineral composition, humoral and cellular immunity

Immune status, which is one of the organism's adaptive potential components, is of considerable interest for studying of objects with unknown toxicity, in particular, novel food. In order to improve the toxicological research methodology there was developed the model of adaptive potential's gradual decline, based on the use of diets with reduced content of vitamins (B1, B2, B3, B6) and minerals ( $Fe^{3+}$  and  $Mg^{2+}$ ). The model effectiveness has been confirmed in experiments with cadmium salts and ethanol, the patterns of their toxic effect enhance on the background of essential substances reducing were identified. The publication considers this model applying possibility for rats' immune status assessment.

The 65-days experiment was carried out on Wistar rats with initial body weight of 90-110 g. 90 Males and 90 females were divided into 3 groups (30 males and 30 females in each group). Rats received a semisynthetic casein diet with optimal (75%) dosage of essential substances (vitamins B1, B2, B3, B6 and mineral substances,  $Fe^{3+}$  and  $Mg^{2+}$ ), marginal (30% for males and 28% for females) and submarginal (19% for males and 18% for females) doses of essential substances.

The humoral and cellular immunity indicators, such as leukocyte profile, lysozyme activity of blood serum, the content of IgG and IgE, and blood serum cytokine profile, the immune organs' mass of all groups' males and females did not show significant differences, which could be linked to the diet composition.

Thus, the decrease of the vitamins, iron and magnesium content in the diet does not cause complex changes of rats' immune status. The offered model of adaptive potential's gradual decline is not optimal for studying immune status. However, the large-scale study of the immune status (studied 18 indicators from 90 males and 90 females) allows us, with a certain degree of confidence, to set the range of physiological fluctuations of these indicators in Wistar rats of the corresponding gender and age. As the level of interleukins at such sample's size has been studied for the first time, the obtained data are unique and will be further used in experimental research.

The project was funded by the Russian Science Foundation grant №16-16-00124.

УДК 615.371

## ИММУНОАДЪЮВАНТЫ ДЛЯ ВАКЦИН: ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ И ИННОВАЦИОННЫЕ БИОПЛАТФОРМЫ

Ю.М. Васильев

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Российская Федерация  
197110, Российская Федерация, Санкт-Петербург, Пудожская ул., д. 7  
e-mail: vasiliev@hpb-spb.com

Представлен анализ проблем и перспектив адъювантов для вакцин (иммуноадъювантов). Продемонстрирована целесообразность исследований и разработки комплексных препаратов «депо плюс иммуномодулятор» и инновационных платформ адъювантов с управляемыми свойствами на основе биополимеров.

**Ключевые слова:** вакцины, иммуноадъюванты, эффективность, безопасность

Успехи современной медицины в части борьбы с инфекционными заболеваниями во многом обязаны вакцинопрофилактике. Так, натуральная оспа была искоренена в прошлом веке, а в настоящее время завершается программа ликвидации полиомиелита. Более того, среди следующих кандидатов на эрадикацию называют корь и краснуху.

В то же время имеющиеся иммунобиопрепараты, в особенности ряд вакцин текущего поколения, обладают неоптимальным сочетанием эффективности, безопасности и экономической целесообразности, особенно при массовом применении. При этом исследования и разработка инновационных вакцин и иммунобиопрепаратов следующего поколения идет с переменным успехом. Например, рекомбинантные вакцины против гриппа, в том числе с пандемическим потенциалом, весьма безопасны, но лишь умеренно иммуногенны.

Для решения этих проблем предложено использовать адъюванты для вакцин – иммуноадъюванты. Наибольшее распространение получили препараты на основе минеральных солей и оснований, в первую очередь – гидроксид алюминия. Однако есть мнение, что этот иммуноадъювант в условиях современных требований к биопрепаратам (GMP, ISO) не преодолел бы даже доклинические исследования. Более того, имеются данные о нейро- и нефротоксичности алюминия за счет аккумуляции в этих органах.

Ограничения адъювантов на основе эмульсии масло/вода (вода/масло) связаны прежде всего с реактогенностью. Так, полный адъювант Фрейнда используется в первую очередь для получения гипериммунной сыворотки животных. Кроме того, в отношении эмульсий на основе сквалена имеются данные о тяжелых отсроченных эффектах (например, «Gulf War syndrome»).

Системные проблемы в области адъювантологии связаны с классификацией и номенклатурой, научным обоснованием механизмов действия, а также аспектами фармацевтической технологии – подходами стерилизации, стабильностью при хранении.

В то же время Российская Федерация имеет уникальный опыт исследований, разработки и практического применения адъювантов, в особенности представляющих собой иммуномодуляторы.

Среди вакцин в целом выделяют живые аттенуированные и инактивированные, причем первые уже сыграли и продолжают играть решающую роль в программах искоренения инфекционных заболеваний человека и животных. Применение адъювантов сможет снять ряд ограничений различных типов вакцин, однако далеко не каждый адъювант будет столь же эффективен и иммуногенен в составе любого варианта вакцины (тип, природа антигена, способ введения и т.п.).

Таким образом, необходима интенсификация исследований и разработки в области иммуноадъювантов, в первую очередь в принципиально новых направлениях, например, комплексных препаратов по

формуле «депо плюс иммуномодулятор». Особый интерес представляют инновационные платформы адъювантов с управляемыми свойствами на основе биополимеров, поскольку позволяют обеспечить максимальную безопасность и эффективность с учетом особенностей конкретного иммунобиопрепарата и даже способа введения.

UDC 615.371

## IMMUNE ADJUVANTS FOR VACCINES: PROBLEMS, PERSPECTIVES AND INNOVATIVE BIOPLATFORMS

Y.M. Vasiliev

*Federal State Unitary Enterprise "State Scientific-Research Institute of Ultra Pure Biopreparations" of the Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation  
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7  
e-mail: vasiliev@hpb-spb.com*

Analysis of problems and perspectives of adjuvants for vaccines (immune adjuvants) is presented. Feasibility of R&D for complex preparations ("depot + immune modulator") and innovative adjuvant platforms with adjustable properties based on biopolymers is demonstrated.

**Key words:** vaccines, immune adjuvants, effectiveness, safety

Vaccines are behind many achievements of modern medicine especially regarding infectious disease control; e.g. small pox was eliminated during the last century, and poliomyelitis eradication program is currently being finalized. Moreover, measles and rubella are next candidates for eradication programs.

Available immune biopreparations, especially current generation vaccines, have a suboptimal combination of effectiveness, safety and economic feasibility, especially during mass administration. At the same time R&D of innovative vaccines and next generation immune biopreparations is proceeding with varying success; e.g., recombinant vaccines against influenza including pandemic are quite safe but not immunogenic enough.

Adjuvants for vaccines – immune adjuvants – are proposed to solve these problems. Preparations based on mineral salts and bases, first of all aluminium hydroxide, are the most widespread. This immune adjuvant, however, may not have passed successfully even preclinical trials under the current regulations (GMP, ISO). Moreover, data are available on neuro- and nephrotoxicity of aluminium due to accumulation in these organs.

Limitations of oil/water (water/oil) emulsion-based adjuvants are determined by reactogenicity; e.g. complete Freund's adjuvant is used first and foremost to obtain animal hyperimmune sera. Moreover, data on severe postponed adverse effects (e.g., Gulf War Syndrome) are available regarding squalene-based emulsions.

Systematic problems for adjuvant R&D are: classification and nomenclature, scientific rationale behind mechanisms of action as well as aspects of pharmaceutical technology – sterilization approaches, shelf life.

At the same time Russian Federation has unique experience in development and application of adjuvants, especially immune modulators.

Live attenuated and inactivated are the main vaccines, and the former have already played and continue to play the principal role in programs of eradication of infectious diseases of humans and animals. Use of adjuvants could counter-play limitations of various types of vaccines, however, not every adjuvant will be as effective and immunogenic for any vaccine variant (type, antigen nature, administration route, etc.).

Intensification of immune adjuvant R&D is thus urgently needed, especially for novel approaches, e.g., complex preparations - "depot plus immune modulator". Innovative adjuvant platforms with adjustable properties based on biopolymers are especially promising due to maximal safety and effectiveness that take features of the specific immune biopreparations and route of administration into account.

УДК 615.371:616-022.7

## ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ СИНЕГНОЙНОЙ

Михайлова Н.А., Калошин А.А., Зимина Е.М., Солдатенкова А.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия  
105064, г. Москва, М. Казенный пер., 5а  
alex-k-1973@yandex.ru

На основе рекомбинантных форм белка наружной мембраны F и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa* сконструирована вакцина для профилактики синегнойной инфекции. Опытные серии рекомбинантной вакцины обладали защитными свойствами от экспериментальной инфекции, что выражалось в трехкратном снижении смертности иммунизированных животных.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*, рекомбинантный белок, белок F наружной мембраны (OprF), анатоксин, рекомбинантная вакцина.

Условно патогенный грамотрицательный микроорганизм *Pseudomonas aeruginosa* продолжает наносить существенный социально-экономический ущерб для здравоохранения во всех странах мира, являясь одним из основных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний человека. Особенностью возбудителя является способность проявлять устойчивость к различным факторам внешней среды и антибактериальным препаратам. Поэтому разработка новых лекарственных средств, предназначенных для профилактики и терапии синегнойной инфекции, является актуальной проблемой.

В ФГБНУ НИИВС имени И. И. Мечникова на протяжении ряда лет проводились исследования по разработке рекомбинантной вакцины синегнойной. В качестве компонентов использованы рекомбинантная форма белка F наружной мембраны (OprF) и рекомбинантный делеционный вариант экзотоксина A (анатоксин), которые являются наиболее протективными антигенами *P. aeruginosa*. Оба рекомбинантных белка синтезировали в клетках *Escherichia coli* и очищали методом аффинной хроматографии.

Наработанные препараты рекомбинантных белков сорбировали на геле гидрооксида алюминия. В результате получили три серии рекомбинантной вакцины синегнойной. Для опытных серий препарата подтверждена стерильность и отсутствие аномальной токсичности на двух видах животных (мышьях и морских свинках). Протективная активность оценена по показателю выживаемости в опытах на аутбредных мышьях. Использовали схему двукратного с двухнедельным интервалом внутрибрюшинного введения препарата. Через две недели после последней иммунизации животных внутрибрюшинно заражали живой вирулентной культурой *P. aeruginosa* штамма PA103. В течение семи дней учитывали смертность мышьях. Рассчитанные индексы эффективности защитных свойств соответствовали: для серии № 01062017 – 3,3, для серии № 02072017 – 3,0 и для серии № 03072017 – 3,3.

В результате проведенного доклинического исследования препаратов трех экспериментальных серий рекомбинантной вакцины, сконструированной на основе рекомбинантных протективных антигенов, выявлена ее безопасность и эффективность для профилактики экспериментальной инфекции, вызываемой синегнойной палочкой.

Работа выполнена в соответствии с Государственным Контрактом от 28 апреля 2017 г. № 14.N08.11.0135 в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» по теме «Доклинические исследования вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, предназначенной для профилактики инфекций, вызываемых синегнойной палочкой».

UDC 615.371:616-022.7

## IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF PSEUDOMONAS RECOMBINANT VACCINE

**Mihailova N.A., Kaloshin A.A., Zimina E.M., Soldatenkova A.V.**

*The Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow*

The vaccine for prevent *Pseudomonas aeruginosa* infection, which is based on the recombinant forms of the outer membrane protein F and toxoid, has been designed. Trial series of the recombinant vaccine possessed protective properties from experimental infection, which was expressed in a threefold decrease in the mortality of the immunized animals.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, recombinant protein, outer membrane protein F, toxoid, recombinant vaccine.

Conditionally pathogenic gram-negative microorganism *Pseudomonas aeruginosa* continues to cause significant socio-economic damage to health in all countries of the world and it is one of the main pathogens of nosocomial diseases of people. The ability to be resistant to various environmental factors and antibacterial medicaments is a feature of the pathogens. Therefore, the development of the new medicines that is intended for the prevention and treatment of *P. aeruginosa* infection is an urgent problem.

Investigation for development a recombinant *Pseudomonas* vaccine has been conducted for several years at the Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. The recombinant form of outer membrane protein F (OprF) and the recombinant deleted form of the exotoxin A (toxoid) have been used as the vaccine components. Those proteins are the most protective antigens of *P. aeruginosa*. The recombinant proteins have been synthesized into the cells of *Escherichia coli* and were purified by the affinity chromatography.

Obtained protein preparations were adsorbed on the gel of aluminum hydroxide. As a result, three lots of recombinant *Pseudomonas* vaccine were reached. Experimental series of the vaccine preparation were sterile and had no an abnormal toxicity. The last was shown on two species of animals (mice and guinea pigs). Protective activity was assessed by the survival rate in experiments on outbred mice. The preparations were injected intraperitoneally, twice, at two-week intervals. After the last immunization, animals were intraperitoneally infected by a live virulent culture of *P. aeruginosa* strain PA103. The mortality of mice was monitoring during seven days. The efficiency index of protective properties corresponded: 3.3 for lot № 01062017, 3.0 for lot № 02072017 and 3.3 for lot № 03072017.

As a result, of the preclinical trial of three experimental lots of recombinant vaccine, that have been designed from recombinant protective antigens, revealed its safety and effectiveness for the prevention from the experimental *P. aeruginosa* infection.

УДК 615.076

## КОНТАМИНАЦИЯ КУЛЬТУР КЛЕТОК ОРТОРЕОВИРУСАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Файзулов Е.Б., Корчевая Е.Р., Марков Д.В., Петруша О.А.**

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия  
 105064, Москва. Малый Казенный переулок, дом 5А  
 e-mail: faizulov@mail.ru  
 телефон: +7 (909) 164-52-77*

Описан случай контаминации культуры клеток ранее неизвестным штаммом трипсин-зависимого орторевовируса млекопитающих. Источником контаминации предположительно являлся один из компонентов питательной среды животного происхождения – трипсин или фетальная бычья сыворотка.

**Ключевые слова:** культура животных клеток, вирусная контаминация, орторевовирус млекопитающих

Культуры клеток животных широко применяются в биотехнологии для наработки биологически активных веществ и вирусов, входящих в состав лекарственных и иммунобиологических препаратов.

Важным требованием, предъявляемым к культурам клеток, используемым в производстве, является отсутствие их контаминации вирусами, бактериями, грибами и микоплазмами (1). В лабораторной и производственной практике наиболее вероятными источниками контаминации вирусами служат сама клеточная линия, фетальная бычья сыворотка (ФБС) или трипсин, получаемый из поджелудочной железы свиней.

Ротавирусы группы А и орторевовирусы выращивали в перевиваемой культуре клеток почки обезьяны MA-104 в присутствии трипсина в среде ДМЕМ с глутамином и гентамицином при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Выявление ротавирусной и орторевовирусной РНК проводили методом ПЦР-РВ с видоспецифическими праймерами. Вирусную геномную РНК анализировали методом электрофореза в ПААГ по Laemmly. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили по Сенгеру в капиллярном секвенаторе. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили в программах MEGA6 и BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Для контроля условий культивирования ротавирусов использовали лабораторные штаммы ротавирусов человека Wa, DS-1 и WI61.

С целью изоляции ротавирусов клетки MA-104 инокулировали фекальными экстрактами от 12 детей с подтвержденной ротавирусной инфекцией и проводили 10-12 пассажей в среде с трипсином. На 5-9 пассажах для 5 из 12 образцов проявилось выраженное цитопатогенное действие (ЦПД). Поскольку в процессе пассирования вируса концентрация ротавирусной РНК в большинстве образцов снизилась до предела чувствительности ПЦР, был сделан вывод, что причиной ЦПД была репродукция не ротавируса, а какого-то другого вируса. Экстракция хлороформом не снижала способность вируса вызывать в культуре клеток ЦПД, что свидетельствовало об отсутствии у вируса липидной оболочки. В опыте по пассированию вируса в отсутствие трипсина после второго пассажа все образцы вирусов перестали вызывать ЦПД, что показывает зависимость репродукции вируса от наличия трипсина. Проведенный гель-электрофорез геномной РНК вируса выявил 10 генных сегментов, которые распределились по схеме 3:3:4, что соответствует электрофоретипу генома орторевовирусов. ПЦР-анализ с праймерами к орторевовирусу млекопитающих подтвердил наличие в исследуемых образцах реовирусной РНК в высокой концентрации. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена полимеразы размером 656 п.н. всех 5 исследуемых образцов вирусов совпали на 100%. Это показывает, что реовирус-контаминант представлен одним штаммом и позволяет предположить его попадание в культуру клеток из одного источника: ФБС, трипсина или активации вируса из самой культуры клеток MA-104. Однако ПЦР-анализ этих материалов, а также ротавируссодержащих клинических образцов, использованных для инокуляции клеток MA-104, не выявил наличия в них реовирусной РНК. Вероятно, концентрация РНК вируса-контаминанта в источнике заражения была ниже предела чувствительности ПЦР. BLAST-анализ показал максимальное сходство вируса с орторевовирусами млекопитающих, выделенными от свиньи, человека, норки и рукокрылых (до 94% гомологии в нуклеотидной последовательности и до 99,5% – в аминокислотной), что позволяет рассматривать его как новый штамм. Проведенный филогенетический анализ позволил с высокой надежностью отнести выделенный вирус к виду Mammalian orthoreovirus (род Reovirus, семейство Reoviridae).

Полученные результаты подчеркивает актуальность контроля на наличие контаминации реовирусом не только реактивов животного происхождения, но и клеточных культур на разных стадиях биотехнологического производства. Поскольку реовирусы ассоциированы с заболеваниями человека (2), такой контроль представляется обязательным.

#### Литература:

1. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. Утверждены Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 года N89.
2. Dermody T.S. et al. *Orthoreoviruses*. *Fields Virology*/editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley. – 6th ed. 2013.



UDC 615.076

## CONTAMINATION OF CELL CULTURES BY MAMMALIAN ORTHOREOVIRUSES

**Faizuloev E.B., Korchevaya E.R., Markov D.V., Petrusha O.A.**

*Federal State Budget Scientific Institution "I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera", Moscow, Russia  
 105064, Moscow. Malii Kazennii pereulok, 5A  
 e-mail: faizuloev@mail.ru  
 phone: +7 (909) 164-52-77*

An incident of cell culture contamination with a previously unknown strain of trypsin-dependent mammalian orthoreovirus was described. The source of the contamination was presumably one of the components of culture medium: trypsin or fetal bovine serum.

**Key words:** animal cell culture, viral contamination, mammalian orthoreovirus

Animal cell cultures are widely used in biotechnology for the production of biologically active substances and viruses that are components of biological products. An important requirement for cell cultures used in biotechnological production is the absence of their contamination with viruses, bacteria, fungi and mycoplasmas (1). In laboratory and manufacturing practice, the cell lines, fetal bovine serum (FBS) or trypsin, obtained from the pancreas of pigs, can serve as sources of virus contamination.

Group A rotaviruses and orthoreoviruses were grown in a monkey kidney cell culture MA-104 in the presence of trypsin in DMEM with glutamine and gentamycin at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator. Detection of rotavirus and orthoreovirus RNA was carried out by the real-time PCR method with species-specific primers. Viral genomic RNA was analyzed by Laemmly electrophoresis in PAGE. Sequencing of PCR products was performed according to Sanger in a capillary sequencer. Nucleotide and amino acid sequences were analyzed in the MEGA6 and BLAST programs (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Laboratory strains of human rotaviruses Wa, DS-1 and WI61 were used to control the conditions of rotavirus culture.

To isolate the rotavirus, MA-104 cells were inoculated with fecal extracts from 12 children with confirmed rotavirus infection and 10-12 passages in a medium with trypsin were performed. At 5-9 passages for 5 of 12 samples showed a cytopathogenic effect (CPE). Since during the passaging of the virus, the concentration of rotavirus RNA in most samples was reduced to the limit of the sensitivity of PCR, it was concluded that the cause of CPE was not rotavirus reproduction, but some other virus. Extraction with chloroform did not reduce the ability of the virus to cause the CPE, which indicated that the virus did not have a lipid envelope. In the experiment on passaging the virus in the absence of trypsin after the second passage all virus samples ceased to cause CPE, which shows the dependence of the virus on the presence of trypsin. The gel electrophoresis of the genomic RNA of the virus revealed 10 gene segments, which were distributed according to the 3:3:4 scheme, which corresponds to the electrophoretotype of the orthoreovirus genome. The PCR analysis with primers to mammalian orthoreovirus confirmed the presence of high concentration reovirus RNA in the cells. Nucleotide sequences of the polymerase gene 656 bp fragment of all 5 virus samples coincided 100%. This shows that the reovirus-contaminant is represented by one strain and suggests its entry into the cell culture from a single source: PBS, trypsin, or virus activation from the MA-104 cells itself. However, the PCR analysis of these materials, as well as the rotavirus-containing clinical samples used to inoculate the MA-104 cells, did not reveal the presence of reovirus RNA in them. Probably, the RNA concentration of the contaminant virus in the source of infection was below the sensitivity limit of PCR. BLAST-analysis showed the maximum similarity of the virus with mammalian orthoreoviruses isolated from the pig, human, mink and bats (up to 94% homology in the nucleotide sequence and up to 99.5% in the amino acid sequence), which makes it possible to consider it as a new strain. The phylogenetic analysis carried out made it possible to relate the isolated virus to the species Mammalian orthoreovirus (genus Reovirus, family Reoviridae) with high reliability.

The obtained results underscore the urgency of the control for the presence of reoviruses not only of reagents of animal origin, but also cell cultures at different stages of biotechnological production. Since reoviruses are associated with human diseases (2), such control seems mandatory.

### References:

1. Rules for conducting research of biological medicines of the Eurasian Economic Union. Approved by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 3, 2016 №89.
2. Dermody T.S. et al. Orthoreoviruses. *Fields Virology* / editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley. - 6th ed. 2013.

УДК 544.77.022

## МНОГОФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ СОРБЦИИ БЕЛКОВ НА КОЛЛОИДНОЕ ЗОЛОТО ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ

Сотников Д.В., Иванов В.С., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия  
119071, Москва, Ленинский проспект 33  
e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru

Проведен анализ состава иммуноаналитических реагентов – конъюгатов бычьего сывороточного альбумина и иммуноглобулина G с золотыми наночастицами, полученных методом Туркевича-Френса. Состав изучался методом флуоресцентной спектроскопии для частиц диаметром от 20 до 50 нм в зависимости от pH среды иммобилизации (от 4–5 до 8–10). Показано влияние pH среды на переход от моно- к полислойной иммобилизации.

**Ключевые слова:** коллоидное золото, наночастицы, иммуноглобулин G, бычий сывороточный альбумин.

Комплексы коллоидного золота (КЗ) с белками используются для решения множества аналитических задач, однако взаимодействие белков с КЗ по-прежнему вызывает множество вопросов. Например, различия констант взаимодействия белков с коллоидным золотом, представленных в разных публикациях, могут достигать пяти порядков. Также нет единого мнения о моно- или полислойной иммобилизации белков. Эти различия могут быть объяснены недостаточной точностью используемых методов, возможными изменениями структуры конъюгатов в ходе их характеристики, а также использованием неунифицированных наночастиц, полученных в разных условиях. Поиск общих закономерностей взаимодействия макромолекул с КЗ нуждается в многофакторном анализе конъюгатов, отличающихся размером частиц, природой сорбируемого белка и его концентрацией, а также составом реакционной среды.

Нами проведено исследование состава конъюгатов между КЗ с диаметром частиц от 20 до 50 нм, полученных методом Туркевича-Френса, и двумя наиболее часто используемыми для конъюгации белками – бычьим сывороточным альбумином (БСА) и иммуноглобулином G (IgG). Охарактеризованы зависимости составов полученных конъюгатов от концентрации белка и pH среды иммобилизации. Исследование проведено с использованием флуоресцентной спектроскопии по разработанной оригинальной методике. Полученные данные демонстрируют, что смещение pH среды иммобилизации от кислых значений (4–5) к щелочным (8–10) сопровождается изменением механизма сорбции белка. В щелочных растворах насыщения поверхности КЗ не наблюдается даже при количестве белка, значительно большем, чем требуется для формирования монослоя, тогда как в кислых растворах белки сорбируются на КЗ лишь до заполнения монослоя. Увеличение максимального количества сорбированного белка при повышении pH означает, что в щелочных растворах на частице КЗ образуется несколько белковых слоев. Таким образом, в зависимости от pH среды может происходить как монослойная, так и полислойная сорбция. Эти данные позволяют объяснить различия результатов, полученных разными группами исследователей.

Исследование финансово поддержано Министерством образования и науки РФ (соглашение № 14.613.21.0080 от 22.11.2017, уникальный идентификатор RFMEFI61317X0080).

UDC 544.77.022

## MULTIFACTOR ANALYSIS OF PROTEINS SORPTION ON COLLOIDAL GOLD FOR OBTAINING OF BIOANALYTICAL REAGENTS

Sotnikov D.V., Ivanov V.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamental Foundations of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
Leninsky prospekt 33, 119071 Moscow, Russia  
e-mail: sotnikov-d-i@mail.ru

The composition of immunoanalytical reactants, conjugates of bovine serum albumin and immunoglobulins G with gold nanoparticles, obtained by the Turkevich-Frens method, was analyzed. The composition was studied by fluorescence spectroscopy for particles ranging in diameter from 20 to 50 nm, depending on the pH of the

immobilization medium (from 4–5 to 8–10). The influence of pH on shift from mono- to polylayer immobilization was demonstrated.

**Key words:** colloidal gold, nanoparticles, immunoglobulin G, bovine serum albumin.

Complexes of colloidal gold (CG) with proteins are used for many analytical tasks, but the interaction of proteins with CG still raises many questions. For example, the differences in interaction constants of proteins with colloidal gold can reach five orders of magnitude. There is also no consensus on the issue of mono- or multilayer immobilization of proteins. These differences can be explained by insufficient accuracy of applied methods, possible changes in the structure of conjugates during their study, and the use of ununified nanoparticles obtained under different conditions. The search for general patterns for the interaction of macromolecules with CG requires a multifactor analysis of conjugates that differ in particle size, the nature of the protein sorbed and its concentration, and the composition of the reaction medium.

We study the composition of conjugates between CG with a particle diameter from 20 to 50 nm, obtained by the Turkevich-Frens method, and two most commonly used for conjugation proteins, bovine serum albumin and immunoglobulins G. The composition of the resulting conjugates is compared with the initial protein concentration and the pH of the immobilization medium. The study was carried out using fluorescence spectroscopy by the developed original technique. The obtained data demonstrate that the change in the pH of the immobilization medium from acidic (4–5) to alkaline values (8–10) is accompanied by a change in the mechanism of protein sorption. In alkaline solutions, the saturation of the surface is not observed, even when the amount of protein is much larger than that required to form a monolayer. At the same time in acidic solutions the proteins are sorbed only until the monolayer is filled. Increasing the maximum amount of sorbed protein with increasing pH means that in alkaline solutions a few of protein layers are formed on CG particles. Thus, depending on the pH of the medium, either monolayer or multilayer sorption can occur. These data make it possible to explain the differences in the results obtained by different groups of researchers.

This study was financially supported by the Ministry of Science and Education of the Russian Federation (grant agreement No. 14.613.21.0080 on 22.11.2017, unique identifier RFMEFI61317X0080).

УДК 616-002.555

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ БЛОКАТОРАМИ АНГИОГЕНЕЗА ПРИ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

**Крамарь Т.В., Голубинская Е.П.**

*Медицинская академия имени С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского», Симферополь, Россия.  
295051 Российская Федерация, г. Симферополь, бул. Ленина 12 кв.37.  
Kramarva@gmail.com*

В работе показаны основные характеристики неоангиогенеза при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких. Выявлены изменения индекса перфузии в зависимости от зоны локализации капилляров, описаны основные параметры, свидетельствующие о неполноценности формирующихся сосудов капиллярного типа, что свидетельствует о возможности использования таргетной терапии.

**Ключевые слова:** фиброзно-кавернозный туберкулез, адресная доставка лекарств, неоангиогенез.

Глобальная эпидемия туберкулеза и увеличение количества больных с лекарственно-устойчивыми формами свидетельствует о неэффективности применяемой химиотерапии и развитии разнообразных осложнений, как общего, так и местного характера. В связи с чем, поиск возможностей доставки лекарственных препаратов, минимально влияющих на общее состояние организма, является одной из приоритетных задач современной науки.

Патогенетически важным аспектом развития и прогрессирования туберкулеза являются процессы васкуляризации. Для оценки интенсивности кровообращения, функциональной полноценности и проницаемости новообразованных сосудов в работе исследовали иммуногистохимическую экспрессию маркеров CD34 (эндотелий сосудов), Collagen-IV (базальные мембраны сосудов). Система визуализации EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link), Code K8012 на автостейнере фирмы DAKO. Морфометрический подсчет пока-

зателей с вычислением индекса перфузии сосудов (ИП) с использованием лицензированного программного обеспечения ImageJ и статистическая обработка результатов.

В результате анализа полученных результатов была установлена неоднородность васкуляризации легочной паренхимы в зависимости от удаленности патологического очага. Максимальное количество CD34 позитивных сосудов капиллярного типа с неравномерной экспрессией collagen-IV ( $R^2=-0,40$ ), и статистически значимым снижением показателей ИП в отношении контрольных образцов интактных легких ( $p<0,05$ ) визуализируется в зоне специфической грануляционной ткани ( $19,47 \pm 0,88$ ). Минимальное число CD34+ четко дифференцированных сосудов артериального и венозного типов с максимальной утолщенной сосудистой стенкой за счет плотной экспрессии collagenIV истонченного эндотелия визуализировалось в фиброзном слое каверны. ИП характеризовался достоверно низкими показателями как по отношению к контролю, так и к грануляционной ткани. В окружающей легочной ткани определяется резкое увеличение количества CD34+ элементов до  $28,00 \pm 1,49$ , при одновременном повышении процентного содержания collagen IV ( $30,34 \pm 1,37\%$ ,  $p<0,05$ ,  $R^2=0,40$ ) и существенного нарастании перфузионной активности сосудистой стенки.

Таким образом, морфологическая несостоятельность новообразованных сосудов, проявляющаяся в отсутствии прогрессии дифференцировки, снижения индекса перфузии приводит к дестабилизации гемодинамических процессов в очаге деструкции и неэффективной доставке как нативных иммунологических протективных факторов, так и экзогенных медикаментозных препаратов.

Анализируя данные о возможностях современной таргетной терапии, можно рекомендовать применение препаратов блокаторов ангиогенеза селективного действия. Применение которых, согласно клиническим испытаниям различных заболеваний, предотвращает взаимодействие эндотелиального фактора роста (VEGF) с его рецепторами на поверхности клеток эндотелия, что приводит к подавлению неоваскуляризации и пролиферации сосудов, а также уменьшает опосредованную VEGF проницаемость сосудов.

UDC 616-002.555

## MORPHOFUNCTIONAL JUSTIFICATION OF TARGET THERAPY WITH ANGIOGENESIS BLOCKERS IN FIBRO-CAVERNOUS TUBERCULOSIS OF LUNGS

**Kramar T.V., Golubinskaya E.P.**

*Medical Academy named after S.I. Georgievsky of Vernadsky CFU, Simferopol, Russia.  
295051, Russian Federation, Simferopol, Lenin bulvar 12/37  
Kramarva@gmail.com*

The main characteristics of neoangiogenesis in fibro-cavernous pulmonary tuberculosis are shown in the work. Changes in the perfusion index depending on the capillary localization zone were found; the main parameters that indicate the inferiority of the new formed capillary-type vessels are described. All it shows the possibility of targeted therapy using.

**Key words:** fibro-cavernous tuberculosis, targeted drug delivery, neoangiogenesis.

The global epidemic of tuberculosis (TB) as well as the increased amount of the patients with drug-resistant forms indicates the chemotherapy ineffectiveness and development of general and local complications. So that, the search of possible delivery for the target drugs with minimal damaging affect on the general state is one of the modern science's hot-points.

One of the pathogenetically important aspects of the TB development and it's progression is the vascularization process.

To evaluate the intensity of blood circulation, functional usefulness and permeability of formed vessels was proceed immunohistochemical investigation with using of CD34 (marker of vascular endothelium) and Collagen-IV (basal membranes of the vessels). Visualization system: EnVision™ FLEX +, Mouse, High pH (Link), Code K8012 with the DAKO autostainer. Morphometric assay with the index of blood vessels perfusion's (PI) calculation was done with licensed ImageJ software followed by statistical processing of the results.

Analysis of the results revealed the vascularization heterogeneity in the pulmonary parenchyma that was dependent on the pathological focus remoteness. The maximal number of CD34 positive capillary vessels with uneven collagen-IV expression ( $R^2 = -0.40$ ), and a statistically significant decrease in PI ( $p < 0.05$ ) was visualized in the zone of specific granulation tissue ( $19,47 \pm 0.88$ ). The minimal number of clearly defined, distinctly differentiated

arterial and venous vessels with a thickened vascular wall due to dense expression of collagen IV of thinned endothelium was visualized in the fibrous layer of the cavern. PI was characterized by reliably low indices both in relation to control and to the granulation tissue. On average, the lung tissue is determined by a significant increase in CD34+ elements up to  $28.00 \pm 1.49$  and perfusion activity of the vascular wall, also a simultaneous increase in the percentage of collagen IV ( $30.34 \pm 1.37\%$ ,  $p < 0.05$ ,  $R3 = 0.40$ ) was revealed.

Thus, the morphological inconsistency of the formed vessels, manifested in the absence of a differentiation, a decrease in the PI, lead to destabilization of hemodynamic processes in the site of destruction and ineffective delivery of both native immunological protective factors and exogenous medications.

Analyzing data about the modern targeted therapy possibilities, the recommendations about using of the angiogenesis selective drugs blockers can be done. The application of which, according to various diseases clinical trials, prevents the interaction of endothelial growth factor (VEGF) with its receptors on the surface of endothelial cells. That leads to the suppression of neovascularization and vessels proliferation, and also reduces VEGF-mediated vascular permeability.

УДК 576.54

## НАНОЧАСТИЦЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СКАФФОЛДОВЫМ БЕЛКОМ DARPIN9.29, ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ К HER2/NEU-СВЕРХЭКСПРЕССИРУЮЩИМ РАКОВЫМ КЛЕТКАМ

Шипунова В. О., Никитин М. П., Деев С. М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, дом 16/10; Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия, 115409, Российская Федерация, Москва, Каширское шоссе, 31; Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия, 117303, Российская Федерация, Москва, Керченская ул., 1А.  
 e-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu  
 e-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu

В данной работе описана разработка новых подходов к биомодификации магнитных и флуоресцентных наночастиц скаффолдовым анти-HER2/неу белком DARPIN9.29 для адресной доставки к раковым клеткам.

**Ключевые слова:** адресная доставка, магнитные наночастицы, флуоресцентные наночастицы, раковые клетки.

В настоящее время значительное внимание исследователей направлено на развитие определённой области персонализированной медицины, а именно, тераностики, которая подразумевает объединение терапевтических и диагностических подходов на одной платформе. Представляется перспективным использовать различные мультифункциональные супрамолекулярные системы на основе наночастиц для различных применений в тераностике, поскольку наноструктуры из-за уникальной физико-химической природы, обладают целым рядом свойств, которые невозможно получить, используя компоненты наночастиц по-отдельности. В данной работе мы описываем синтез магнитных и флуоресцентных наночастиц, которые селективно связываются с HER2/неу-положительными клетками. Онкомаркер HER2/неу сверхэкспрессируется примерно в 20-30% случаев рака молочной железы и имеет важное клиническое значение. Впервые в данной работе был разработан ряд уникальных подходов для биомодификации наночастиц скаффолдовым белком DARPIN9.29, который высокоселективно распознаёт HER2/неу ( $K_d = 3.8$  нМ). Данные наноформуляции были получены с использованием неприродных пептидов, способных связывать поверхность наночастиц как твёрдую фазу, и с использованием белкового модуля барназа\*барстар как «молекулярного клея» между наночастицами и скаффолдовым белком. Рибонуклеаза барназа (12 кДа) и её природный ингибитор барстар (10 кДа) являются белками бактериального происхождения, которые обладают чрезвычайно быстрой кинетикой и высокой аффинностью связывания ( $K_{aff} \sim 10^{14}$  М<sup>-1</sup>), что сравнимо только с широко известной парой стрептавидин\*биотин. Дарпины (Designed Ankyrine Repeat Proteins) – относительно новый класс распознающих молекул неиммуноглобулиновой природы, которые обычно получают методами рибосомного или фагового дисплея. Этот класс белков является идеальным кандидатом для проведения генно-инженерных манипуляций и включения их в состав сложных молекул

с несколькими функциями.

Предложенная платформа для биомодификации поверхности наночастиц является быстрой (процесс занимает несколько минут), сохраняет функциональность и ориентированность белков, и позволяет четко регулировать количество и отношение присоединяемых к поверхности частицы молекул.

Полученные магнитные и флуоресцентные частицы сохраняли агрегационную и седиментационную стабильность в физиологических условиях и селективно взаимодействовали с HER2/neu-позитивными клетками, что было продемонстрировано рядом молекулярно-биологических методов. Связывание полученных наночастиц с клетками-мишенями количественно оценивали с использованием ранее разработанного нами метода MPQ-цитометрии [1; 2]. Метод основан на нелинейных свойствах намагничивания магнитных наночастиц и позволяет измерять малое изменение магнитной восприимчивости в реальном времени (до 10<sup>-8</sup>) при комнатной температуре, что обеспечивает субнанограммную чувствительность наночастиц в объеме 20 мкл.

Данное исследование является шагом к созданию наноструктур для терапии и диагностики онкологических заболеваний. Применение таких нацеленных наночастиц открывает новые возможности для разработки новых эффективных агентов для онкотерапии.

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80105 «мол\_эв\_а» (модификация наночастиц, работа с клеточными культурами) и финансовой поддержке Российского Научного Фонда в рамках проекта № 17 74 20146 (модификация белков, синтез наночастиц).

*Литература:*

1. Maxim P. Nikitin, Victoria O. Shipunova, Sergey M. Deyev, Petr I. Nikitin, *Biocomputing based on particle disassembly // Nature nanotechnology*. - 2014. - Т. 9. № 9. С. 716–722.
2. V. O. Shipunova, M. P. Nikitin, P. I. Nikitin, S. M. Deyev, *MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle-cell interactions // Nanoscale*. - 2016. - Т. 8. № 25. С. 12764–12772.

UDC 576.54

## **NANOPARTICLES MODIFIED WITH SCAFFOLD PROTEIN DARPIN9.29 FOR TARGETED DELIVERY TO HER2/NEU-OVEREXPRESSING CANCER CELLS**

**Shipunova V. O., Nikitin M. P., Deyev S. M.**

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7, Miklukho-Maklaya St., 16/10;  
National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russia, 115409, Russian Federation Moscow, Kashirskoe shosse, 31;  
Moscow Institute of Physics & Technology, Dolgoprudny, Russia, 117303, Russian Federation, Moscow, Kerchenskaya st. 1 "A".  
e-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu*

Here we show the development of novel approaches for the biomodification of magnetic and fluorescent nanoparticles with the scaffold anti-HER2/neu protein DARPIn9.29 for the targeted delivery to cancer cells.

**Key words:** targeted delivery, magnetic nanoparticles, fluorescent nanoparticles, cancer cells.

At present, significant attention of researchers is being directed toward one certain area of personalized medicine, namely, theranostics, which implies the combination of diagnostic and therapeutic approaches on a single platform. It seems promising to use different multifunctional supramolecular systems based on nanoparticles for theranostic applications, because different nanostructures, due to their physico-chemical properties, possess a number of properties that are impossible to obtain using different components individually. Here we show the development of magnetic and fluorescent nanoparticles that selectively bind to HER2/neu-positive cancer cells. HER2/neu oncomarker is overexpressed in ~20-30% cases of breast cancer and has important clinical value. For the first time, a number of unique approaches for the biomodification of nanoparticles with the scaffold protein DARPIn9.29, which highly specifically recognizes HER2/neu (KD = 3.8 nM), has been developed in this work. These nanoformulations were obtained through the unnatural peptides capable of binding the nanoparticles surface as solid phase, and with the use of the Barnase\*Barstar module as a "molecular glue" between nanoparticles and scaffold protein. Ribonuclease Barnase (12 kDa) and its natural inhibitor Barstar (10 kDa) are proteins of bacterial

origin, which exhibit extremely fast kinetics and high affinity of binding ( $K_{aff} \sim 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ), which is comparable only to well-known streptavidin\*biotin pair. DARPins (Designed Ankyrine Repeat Proteins) are the novel class of recognition molecules of a non-immunoglobulin nature that are obtained by ribosomal or phage display methods. This class of proteins is an ideal candidate for carrying out genetic engineering manipulations and incorporating them into complex molecules with several functions. The proposed bioengineering platform for nanoparticle biomodification is rapid (minutes-scale), preserves the protein functionality and orientation, and enables excellent control over the number and ratio of attached molecules. The obtained magnetic and fluorescent particles retained aggregative and sedimentation stability under physiological conditions and selectively interacted with HER2/neu-positive cells, as was demonstrated by a number of molecular biological methods. Binding of the obtained nanoparticles with target cells was quantitatively estimated by the original previously developed MPQ-cytometry method [1; 2]. The method is based on the non-linear magnetization properties of magnetic nanoparticles and allows real-time measurement of a very small relative variation of magnetic susceptibility up to  $10^{-8}$  at room temperature, thus providing subnanogram sensitivity of nanoparticles in 20  $\mu\text{l}$  volume.

This study is a step towards the creation of nanostructures for the therapy and diagnostics of oncological diseases. Application of such targeted nanoparticles opens up new possibilities for designing new effective agents for cancer theranostics.

The work was partially supported by Russian Foundation for Basic Research and by the National Intellectual Development Foundation (NIDF) according to the research project № 17-34-80105 "mol\_ev\_a" (nanoparticle modification, cell culture) and the Russian Science Foundation grant № 17-74-20146 (protein modification, nanoparticle synthesis).

#### References:

1. Maxim P. Nikitin, Victoria O. Shipunova, Sergey M. Deyev, Petr I. Nikitin, *Biocomputing based on particle disassembly // Nature nanotechnology*. - 2014. - T. 9. № 9. С. 716–722.

2. V. O. Shipunova, M. P. Nikitin, P. I. Nikitin, S. M. Deyev, *MPQ-cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle-cell interactions // Nanoscale*. - 2016. - T. 8. № 25. С. 12764–12772.

УДК 602.68:57.083.3+577.175.326

## НОВАЯ ПАНЕЛЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕМУ ГОРМОНУ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ

Порываева В.А., Могильных А.К., Агафонова О.А., Вторушина И.А., Усикова Л.А., Рукавишников М.Ю.

АО «Вектор-Бест», Россия, Новосибирская обл., р.п.Кольцово, а/я 121  
 e.mail: poryvaeva@vector-best.ru

Получена и исследована новая панель моноклональных антител (МоАТ) к лютеинизирующему гормону человека (ЛГ). Отобраны пары моноклональных антител для количественного определения ЛГ в «сэндвич»-варианте ИФА.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела, лютеинизирующий гормон человека, иммуноферментный анализ, диагностика.

Количественное определение содержания ЛГ в сыворотке крови может быть использовано для оценки гормонального статуса, диагностики и контроля эффективности терапии нарушений репродуктивной функции, бесплодия. Моноклональные антитела к ЛГ являются обязательным компонентом диагностических наборов для количественного определения содержания этого гормона. ЛГ относится к гликопротеидным гормонам наряду с фолликулостимулирующим (ФСГ), хорионическим гонадотропным (ХГЧ) и тиротропным (ТТГ) гормонами. Все гликопротеидные гормоны имеют общую  $\alpha$ -субъединицу и различаются своими  $\beta$ -субъединицами. При этом существует высокая степень гомологии по аминокислотной последовательности между  $\beta$ -субъединицами для ЛГ и ХГЧ, меньшая - для ЛГ и ФСГ.

Для иммунизации мышей линии BALB/c использовали ЛГ производства «Lee Biosolutions». В результате слияния спленоцитов 3-х иммунизированных мышей с клетками NS1 нами были получены 530 гибридом, стабильно синтезирующих АТ к ЛГ человека. Для уточнения специфичности гибридных АТ исследовали их перекрёстные реакции в непрямом ИФА с ХГЧ производства Московского эндокринного завода, а также ФСГ и ТТГ производства «Lee Biosolutions». Оказалось, что 443 гибридомы производили АТ, которые одинаково хорошо связывались со всеми гликопротеидными гормонами и, очевидно, имели специфичность к  $\alpha$ -субъединице. И только 87 гибридом показали разные титры на разных гормонах. Из

них 25 гибридом синтезировали АТ только к ЛГ, 30 – к ЛГ и ХГЧ, 2 – к ЛГ и ФСГ, 21 – к ЛГ, ФСГ и ХГЧ, остальные – смеси АТ. Большая часть образцов полученных гибридомных АТ (87%) реагировали с линейными эпитопами, что следовало из положительной реакции с ЛГ, денатурированным с помощью SDS и 2-меркаптоэтанола. Для клонирования отобрали 9 гибридом с АТ высокоспецифичными к ЛГ, 1 – с реагирующими как с ЛГ, так и с ФСГ, 1 – с реакцией с ЛГ, ХГЧ и ФСГ. Моноклональные антитела нарабатывали в мышах, очищали и синтезировали их пероксидазные конъюгаты. В дальнейших исследованиях использовали также 6 МоАТ со специфичностями к ЛГ и ХГЧ, полученные нами ранее в рамках разработки МоАТ к ХГЧ и ЛГ.

С помощью конъюгатов МоАТ к  $\beta$ -субъединице ЛГ мы провели эпитопное картирование  $\beta$ -субъединицы ЛГ в составе гормона. Найдены 6 групп моноклональных АТ, показывающих высокую взаимную конкуренцию за сорбированный ЛГ в конкурентном ИФА. Это позволяет предположить наличие по меньшей мере 6-ти отдельных эпитопов на  $\beta$ -субъединице ЛГ. Ряд МоАТ демонстрировали нересипрочную конкуренцию друг с другом, что, по-видимому, объясняется определёнными конформационными изменениями ЛГ при взаимодействии с некоторыми МоАТ.

Мы подбирали пары из 17 очищенных МоАТ и 17 соответствующих пероксидазных конъюгатов МоАТ для определения ЛГ в «сэндвич»-варианте ИФА с одновременной инкубацией. 10 МоАТ в этом исследовании были высокоспецифичны к ЛГ. В работу брали концентрации ЛГ 0,1 МЕ/мл, 10 мМЕ/мл, 1 мМЕ/мл, 0,1 мМЕ/мл. Мы исследовали 240 пар, которые по нашим предположениям должны определять только ЛГ, так как один из партнёров или сразу оба реагируют специфически только с ЛГ. 27 из них не определяли ЛГ, так как МоАТ-партнёры относились к одной группе конкуренции и связывались с одним эпитопом. Остальные пары показали разную чувствительность в определении ЛГ. 41 пара МоАТ дала чувствительность для ЛГ выше 0,1 мМЕ/мл. Показано, что эти пары высокоспецифичны к ЛГ и не выявляют ХГЧ и ФСГ в диапазоне концентраций 0,1 МЕ/мл - 0,1 мМЕ/мл.

UDC 602.68:57.083.3+577.175.326

## A NEW DIAGNOSTIC PANEL OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN LUTEINIZING HORMONE

*Poryvaeva V.A., Mogilnykh A.K., Agafonova O.A., Vtorushina I.A., Usikova, L.A., Rukavishnikov M.Yu.  
JSC "Vector-best", POB 121, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia  
e.mail: poryvaeva@vector-best.ru*

A new panel of monoclonal antibodies (MoAb) to human luteinizing hormone (LH) was developed and investigated. Pairs of monoclonal antibodies were selected for quantitative determination of LH in the sandwich ELISA.

**Key words:** monoclonal antibodies, human luteinizing hormone, immunoassay, diagnostics.

Quantitative determination of serum LH can be used to assess the hormonal status as well as to measure and monitor the effectiveness of therapy of disorders of the reproductive function and infertility. Monoclonal antibodies to LH are necessary components of diagnostic kits for quantitative determination of this hormone concentration. LH belongs to glycoprotein hormones along with follicle-stimulating hormone (FSH), human chorionic gonadotropin (HCG) and thyrotrophic hormone (TTH). All glycoprotein hormones share a common  $\alpha$ -subunit and differ only in their  $\beta$ -subunits. There is a high degree of homology in the amino acid sequence between  $\beta$ -subunits for LH and HCG, and there is a lower degree of homology for LH and FSH.

LH (Lee Biosolutions) was used to immunize BALB/c mice. As a result of fusion of splenocytes of 3 mice immunized with NS1 cells, we obtained 530 hybridomas consistently synthesizing Abs to human LH.

To determine the specificity of hybridomic Abs, we studied their cross-reactivity in the indirect ELISA with HCG (Moscow endocrine plant) as well as FSH and TTH (Lee Biosolutions). It turned out that 443 hybridomas produced Abs, which bound equally well with all glycoprotein hormones and obviously possessed specificity for the  $\alpha$ -subunit. And only 87 hybridomas showed different titers on different hormones. Twenty-five of these hybridomas synthesized Abs only to LH, 30 – to LH and HCG, 2 – to LH and FSH, 21 – to LH, FSH and HCG, and the rest – to Ab mixture. Most specimens of obtained hybridomic Abs (87%) reacted with linear epitopes, which followed from a positive reaction with LH denatured with SDS and 2-mercaptoethanol.

Nine hybridomas with Abs highly specific for LH, 1 with those reacting both with LH, and FSH, and 1 with those reacting with LH, HCG and FSH were selected for cloning. Monoclonal antibodies were produced in mice, and their peroxidase conjugates were purified and synthesized. Further studies involved 6 MoAbs specific for LH and HCG we obtained previously while developing MoAbs to HCG and LH.

We performed epitope mapping of the  $\beta$ -subunit of LH as part of the hormone using conjugates of MoAbs to



the  $\beta$ -subunit of LH. Six groups of monoclonal Abs showing a high level of mutual competition for sorbed LH in the competitive ELISA were found. This suggests the presence of at least 6 individual epitopes on the  $\beta$ -subunit of LH. A number of MoAbs showed non-reciprocal competition with each other, which apparently is due to certain conformational changes in LH in the interaction with some MoAbs.

We selected pairs of 17 purified MoAbs and 17 corresponding peroxidase conjugated MoAbs to determine LH in the sandwich ELISA with simultaneous incubation. Ten MoAbs were highly specific for LH in this study. The work involved LH concentrations of 0.1 IU/ml, 10 mIU/ml, 1 mIU/ml and 0.1 mIU/ml. We investigated 240 pairs, which, according to our assumptions, should determine only LH because one of the partners or both react specifically only with LH. Twenty-seven of them did not determine LH as partner MoAbs belonged to the same competition group and bound to the same epitope. The rest of the pairs showed different sensitivities in LH determination. 41 pairs of MoAbs showed a sensitivity for LH higher than 0.1 mIU/ml. It was shown that these pairs were highly specific for LH and did not detect HCG and FSH in the concentration range from 0.1 IU/ml to 0.1 mIU/ml.

УДК 612.017.1

## НОВЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

**Бязрова М.Г., Филатов А.В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия  
 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24  
 e-mail. mbyazrova@list.rumailto:manhva@yandex.ru*

Разработан метод стимуляции В-лимфоцитов периферической крови человека, который обеспечивает их пролиферацию и дифференцировку из наивных клеток в зрелые плазмобласты.

**Ключевые слова:** В-лимфоциты человека, секвенирование генов Ig, фидерные клетки.

Первым удачным подходом к получению моноклональных антител явилась гибридная технология. Однако применение этого метода для получения человеческих антител столкнулось со значительными трудностями, которые были преодолены только после создания мышей, трансгенных по генам Ig человека. Такие мыши строго лицензируются и доступ к ним очень ограничен, поэтому для получения человеческих моноклональных антител более широкое распространение получила технология фагового дисплея. Наряду с неоспоримыми достоинствами эта технология имеет также существенные недостатки, что отодвинуло ее на второй план. В последние годы стали разрабатываться подходы, которые принято относить к новому поколению методов получения человеческих моноклональных антител. Эти подходы связаны с секвенированием генов Ig с их последующей экспрессией в клетках-продуцентах. Для секвенирования используются два альтернативных метода: секвенирование из единичных клеток и высокопроизводительное секвенирование. Наряду с этим появились сообщения о возможности получения стабильных линий В-лимфоцитов, секретирующих Ig.

В нашей лаборатории разрабатываются методы стимуляции В-лимфоцитов с последующим выведением моноклональных линий В-клеток. В качестве фидерных стимулирующих клеток мы использовали эритроидные клетки K562, а также клетки аденокарциномы A549, которые были стабильно трансфицированы геном CD40L. В присутствии фидерных клеток и при добавлении IL-21 В-лимфоциты, выделенные из периферической крови человека, демонстрировали устойчивый рост в течении 7 дней. За это время набор их поверхностных антигенов менялся от фенотипа, характерного для наивных клеток до фенотипа зрелых плазмобластов. Нами было изучено влияние некоторых других костимуляторных молекул на пролиферацию и дифференцировку В-клеток. Подбор полноценного стимулирующего коктейля позволит в будущем сравнительно просто получать клетки, секретирующие человеческие моноклональные антитела.

UDC 612.017.1

## NEW METHODS OF HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY GENERATION

**Byazrova M.G., Filatov A.V.**

*National Research Center - Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation  
115478, Russia Federation, Moscow, Kashirskoe shosse 24.  
e-mail. mbyazrova@list.ru*

A method for stimulating B lymphocytes from human peripheral blood has been developed, which ensures their proliferation and differentiation from naive cells to mature plasmablasts.

**Key words:** human B lymphocytes, Ig sequencing, feeder cells.

The first successful approach to obtaining monoclonal antibodies was hybridoma technology. However, the use of this method for the production of human antibodies encountered with significant difficulties, which were overcome only after the creation of mice transgenic for human Ig genes. Such mice are strictly licensed and access to them is very limited, so the phage display technology has become more widely used to obtain human monoclonal antibodies. Along with undeniable advantages, this technology has also significant drawbacks, which pushed it to second line. In recent years, approaches have begun to be developed that are generally attributed to a new generation of methods for the production of human monoclonal antibodies. These approaches are associated with the sequencing of Ig genes with their subsequent expression in producer cells. For sequencing, two alternative methods are used: single cell sequencing and high-throughput sequencing. Along with this, there were reports of the possibility of obtaining stable B lymphocytes lines secreting Ig.

In our laboratory methods of B lymphocytes stimulation for the subsequent production of monoclonal B cells lines are developed. As feeder stimulating cells, we used erythroid K562 cells, as well as adenocarcinoma A549 cells, which were stably transfected with the CD40L gene. In the presence of feeder cells and with the addition of IL-21, B-lymphocytes isolated from human peripheral blood showed stable growth for 7 days. During this time, the pattern of their surface antigens changed from the phenotype characteristic of naive cells to the phenotype of mature plasmablasts. We have studied the effect of some other costimulatory molecules on the proliferation and differentiation of B cells. The selection of suitable stimulating cocktail will allow in the future relatively easy to generate cells that secrete human monoclonal antibodies.

УДК:571.27

## ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ И ВРЕМЕНИ ЦИРКУЛЯЦИИ В КРОВИ МУЛЬТИМЕРНЫХ ПЕГИЛИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ АНТИТЕЛ

**Холоденко Р.В., Калиновский Д.В., Доронин И.И., Деев С.М., Холоденко И.В.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
e-mail: khol@mail.ru*

Проведена оценка цитотоксических эффектов нескольких вариантов мультимерных антиген-связывающих фрагментов GD2-специфических антител на GD2-позитивных опухолевых клеточных линиях. Получены флуоресцентно-меченые мономерные и мультимерные фрагменты GD2-специфических антител, с использованием которых было показано значительное увеличение времени циркуляции модифицированных фрагментов антител в крови мышей линии BALB/c.

**Ключевые слова:** ганглиозид GD2, иммунотерапия опухолей, фрагменты антител.

Создание эффективных таргетных противоопухолевых препаратов, направленных на GD2-позитивные опухоли, к которым относятся нейробластома, ряд сарком, мелкоклеточный рак легкого, глиомы, меланома и другие типы опухолей, является актуальной задачей. Единственный одобренный препарат таргетной терапии GD2-позитивных опухолей Unituxin, представляющий собой химерное моноклональное анти-GD2

антитело и применяемый только в США и странах Западной Европы, не является оптимальным противоопухолевым препаратом по причине значимых побочных эффектов и неадекватной эффективности.

В своей работе мы доказали, что ганглиозид GD2 может выступать рецептором клеточной гибели при взаимодействии с GD2-специфичными антителами и их антиген-связывающими фрагментами, и что индукция прямой клеточной гибели может являться важным механизмом противоопухолевой активности GD2-связывающих молекул [1]. В связи с этим фрагменты GD2-специфичных антител имеют потенциал практического применения, поскольку обладают рядом преимуществ по сравнению с полноразмерными антителами [2]. В работе методом сайт-направленного пегилирования были созданы несколько вариантов модифицированных scFv-фрагментов GD2-специфичных антител. Нами было показано, что в отличие от мономерных фрагментов антител пегилированные мультимерные фрагменты анти-GD2 антител обладают большей стабильностью, а также характеризуются усиленными цитотоксическими эффектами на GD2-позитивных опухолевых линиях. На мышах линии BALB/c показано, что модифицированные фрагменты антител имеют значительно более длительное время циркуляции в крови по сравнению с мономерными немодифицированными фрагментами. Полученные данные говорят о возможном использовании модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител в терапии GD2-позитивных опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (грант №15-29-01300).

#### Литература:

1. I.I. Doronin, P.A. Vishnyakova, I.V. Kholodenko, E.D. Ponomarev, D.Y. Ryazantsev, I.M. Molotkovskaya, R.V. Kholodenko. *Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells.* // *BMC Cancer*. 2014. 14(1):295.
2. R.V. Kholodenko., D.V. Kalinovsky, I.I. Doronin, E.D. Ponomarev, I.V. Kholodenko. *Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations.* // *Curr Med Chem*. 2017. doi: 10.2174/0929867324666170817152554.

UDC:571.27

## ANALYSIS OF CYTOTOXIC EFFECTS AND CIRCULATION TIME IN THE BLOOD OF MULTIMERIC PEGYLATED FRAGMENTS OF GD2-SPECIFIC ANTIBODIES

**Kholodenko R.V., Kalinovsky D.V., Doronin I.I., Deyev S.M., Kholodenko I.V.**

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, 117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7, Miklukho-Maklaya St., 16/10  
e-mail: khol@mail.ru*

**Key words:** ganglioside GD2, cancer immunotherapy, antibody fragments.

The development of effective targeted drugs for treatment of GD2-positive tumors, which include neuroblastoma, sarcomas, small cell lung cancer, gliomas, melanoma and other types of tumors, is the actual problem. Unituxin, chimeric monoclonal anti-GD2 antibodies, is the only approved drug targeting for GD2-positive tumors. It is used only in the US and Western Europe and has restrictions for applying due to significant side effects and non-maximal efficacy.

In our work, we proved that ganglioside GD2 can act as a cell death receptor after binding with GD2-specific antibodies and their antigen-binding fragments and that induction of direct cell death could be an important mechanism of antitumor activity of GD2-binding molecules [1]. In this regard, fragments of GD2-specific antibodies have potential for practical use, since they have a number of advantages over full-length antibodies [2]. In the work using site-directed pegylation we created several variants of modified scFv fragments of GD2-specific antibodies. We have shown that, in contrast to monomeric antibody fragments, the pegylated multimeric fragments of anti-GD2 antibodies are more stable, and also have enhanced cytotoxic effects on the cells of GD2-positive tumor cell lines. We have shown that the modified antibody fragments have a significantly longer circulating time in the blood of BALB/c mice compared to the unmodified monomeric fragments. The obtained data indicate the possible use of modified fragments of GD2-specific antibodies for the therapy of GD2-positive tumors.

The work was financially supported by The Russian Foundation for Basic Research (RFBR research project 15-29-01300).

#### References:

1. I.I. Doronin, P.A. Vishnyakova, I.V. Kholodenko, E.D. Ponomarev, D.Y. Ryazantsev, I.M. Molotkovskaya, R.V. Kholodenko. *Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells.* // *BMC Cancer*. 2014.

14(1):295.

2. R.V. Kholodenko., D.V. Kalinovskiy, I.I. Doronin, E.D. Ponomarev, I.V. Kholodenko. *Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations. // Curr Med Chem. 2017. doi: 10.2174/0929867324666170817152554.*

УДК: 616-002.182

## ПЕРСПЕКТИВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ У БОЛЬНЫХ САРКОИДОЗОМ

Лазарева Н.М. <sup>1,3</sup>, Кудрявцев И.В. <sup>1,2</sup>, Серебрякова М.К. <sup>2</sup>, Баранова О.П. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия.

<sup>3</sup> ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Определение субпопуляций Т-хелперов на основе экспрессии ключевых хемокиновых рецепторов при саркоидозе важны для изучения иммунопатогенетических механизмов формирования гранулем с целью поиска возможных методов лечения заболевания.

**Ключевые слова:** Саркоидоз; гранулема; Т-хелперы; хемокины.

Саркоидоз – это системная патология иммунной системы неизвестной этиологии, характеризующаяся образованием эпителиоидно-клеточных гранулём без признаков некроза. Более чем в 90% случаев поражаются легкие [1, 4]. При образовании саркоидных гранулём играют роль макрофаги, дендритные клетки и лимфоциты, а также цитокины и хемокины, продуцируемые этими клетками [3]. По-видимому, именно Т-хелперы (Th) и синтезируемые ими растворимые молекулы принимают участие в регуляции процессов, приводящих к формированию гранулём при остром и хроническом дебюте саркоидоза. Определение субпопуляций Th с учетом экспрессии на них хемокиновых рецепторов позволит выявить различия в иммунологических механизмах гранулемообразования при разных вариантах данного заболевания. Тогда как определения патогенетически значимых цитокинов и хемокинов помогут разработать новые подходы к диагностике и лечению саркоидоза [3, 4].

Изучить особенности субпопуляционного состава Th различного уровня дифференцировки на основании экспрессии ключевых хемокиновых рецепторов в периферической крови больных с острым и хроническим дебютом саркоидоза.

Методом проточной цитометрии (Navios™, Beckman Coulter, США) исследованы образцы крови больных с впервые выявленным нелеченым саркоидозом (n=57) и условно здоровых лиц (n=26).

Острый дебют саркоидоза отмечался в 19% (11/57), хронический в 81% (46/57) случаев. У больных с хроническим началом саркоидоза относительное содержание Th (40,48% (34,49; 45,01)) было выше, чем у больных с острым началом и условно здоровых лиц (52,94% (41,21; 57,36) и 47,22% (41,93; 52,74), p=0,006 и p <0,001). Анализ CD45RA- Th показал, что уровень циркулирующих Th1 (CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4-) был ниже при хроническом саркоидозе относительно группы контроля (11,23% (8,67; 16,30) и 15,90% (12,28; 21,09), p=0,008). Содержание Th17/Th22 (CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4+) было выше при хроническом дебюте саркоидоза относительно группы с острым и контрольной группой (14,54% (11,45; 16,63) против 10,62% (8,86; 14,62) и 11,43% (9,68; 14,07), p=0,023, p=0,028). У больных с хроническим саркоидозом повышено содержание DP Th17 с фенотипом CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4+ относительно группы контроля (14,22% (10,41; 17,82) и 10,82% (8,68; 12,47), p=0,001).

Выводы. При хроническом дебюте саркоидоза в периферической крови достоверно снижено число всех Th. В «зрелых» субпопуляциях Th достоверно снижено количество Th1, повышено количество Th17/Th22 и DP Th17 у больных с хроническим дебютом относительно группы контроля. Выявленные особенности распределения субпопуляций Th в периферической крови больных саркоидозом могут свидетельствовать об их важной роли в механизмах образования гранулём при разных вариантах начала заболевания. Определение ключевых субпопуляций Th позволит определить спектр патогенетически значимых для саркоидоза цитокинов и хемокинов. Полученные результаты могут помочь в поиске экспериментальных альтернативных методов лечения саркоидоза на основе антицитокиновой и антихемокиновой терапии.

Литература:

1. Ярилин А.А. Иммунология - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с. : ил. 2. Abbas A., Lichtman AH, Pillai S Cellular and Molecular Immunology, Eighth edition. – Elsevier, 2015– 544 p. 3. Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B. Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis // *Front Immunol.* 2013. Vol. 4:437. P. 1-9. 4. Sakthivel P, Bruder D. Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis // *Curr Opin Hematol.* 2017. Vol. 24. № 1. P. 59-65.

UDC 616-002.182

## PROSPECTS OF DETERMINATION OF T-HELPER CELLS SUBSETS BASED ON EXPRESSION OF CHEMOKINE RECEPTORS IN PATIENTS WITH SARCOIDOSIS

Lazareva N.M. <sup>1,3</sup>, Kudryavtsev I.V. <sup>1,2</sup>, Serebriakova M.K. <sup>2</sup>, Baranova O.P. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia.

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", Saint Petersburg, Russia.

<sup>3</sup> Federal State Unitary Enterprise "State Research Institute of Highly Pure Biopreparations" FMBA of Russia, Санкт-Петербург, Saint Petersburg, Russia.

The determination of T-helper cells subsets based on the expression of chemokine receptors in sarcoidosis is important for the study of immunopathogenetic mechanisms of granuloma formation in order to find new methods of treating the disease.

**Key words:** Sarcoidosis; granuloma; T-helper cells; chemokines.

Sarcoidosis is multisystem disorder of the immune system of unknown cause, characterized by the formation of noncaseating epithelioid-cell granulomas, affecting the lungs in more than 90% cases [1, 4]. Complex interactions between macrophages, dendritic cells and lymphocytes, as well as the balance of their cytokines and chemokines initiates the granuloma formation in sarcoidosis [3]. Different subsets of "polarized" T-helper cells (Th) as well as their soluble factors play the central part in regulation of granuloma formation in the acute and chronic sarcoidosis. The determination of Th subsets, based on the expression of chemokine receptors, will help understand the immunological mechanisms of granuloma formation in different variants of the disease. The analysis of cytokines and chemokines can contribute to the search for new alternative treatment and diagnostics of sarcoidosis [3, 4].

The aim of the investigate the balance between peripheral blood CD45RA-negative Th subsets purified on the analysis of chemokine receptors co-expression in patients with acute and chronic sarcoidosis.

The Th subsets of peripheral blood were evaluated by flow cytometry (Navios™, Beckman Coulter, USA) in 57 patients with sarcoidosis and 26 healthy controls.

The acute debut of sarcoidosis was determined in 19% (11/57), and chronic in 81% (46/57) cases. In 40.48% (34.49, 45.01) of patients with chronic sarcoidosis the level of the general Th population was significantly decreased in comparison with acute sarcoidosis and healthy controls (52,94% (41,21; 57,36) и 47,22% (41,93; 52,74), p=0,006 and p <0,001). In the "mature" Th subsets (CD3+CD4+CD45RA-) the percentage of Th1 (CXCR5-CXCR3+CCR6-CCR4-) was significantly decreased in chronic sarcoidosis in comparison with healthy controls(11.23% (8.67; 16.30) and 15.90% (12.28; 21.09), p=0.008).The percentage of Th17/Th22 (CXCR5-CXCR3-CCR6+CCR4+)was significantly higher in chronic sarcoidosis than in acute sarcoidosis and healthy controls(14.54% (11.45; 16.63) vs 10.62% (8.86; 14.62) and 11.43% (9.68; 14.07), p=0.023, p=0.028). In group of patients with chronic sarcoidosis double-positive DP Th17 (CXCR5-CXCR3+CCR6+CCR4+) were significantly higher in comparison with healthy controls (14.22% (10.41; 17.82) and 10.82% (8.68; 12.47), p=0.001).

Conclusion. The total Th population of peripheral blood was significantly decreased in patients with chronic sarcoidosis. Within CD45RA- Th subsets the percentage of Th1 was significantly decreased, but the level of Th17/Th22 and DP Th17 was significantly higher in patients with chronic sarcoidosis in comparison with healthy controls. This disturbance in Th subsets in the peripheral blood of patients with sarcoidosis may indicate their important role in the mechanisms of granuloma formation in different variants of the disease. The determination of Th subsets will help to find the spectrum of pathogenetically significant cytokines and chemokines in sarcoidosis and experimental alternative method for the treatment, anti-cytokine and anti-chemokine.

References:

1. Yarilin A.A. *Immunology* - M.: GEOTAR-Media, 2010. - 752 p. 2. Abbas A., Lichtman AH, Pillai S *Cellular and Molecular Immunology, Eighth edition*. – Elsevier, 2015– 544 p. 3. Broos CE, van Nimwegen M, Hoogsteden HC, Hendriks RW, Kool M, van den Blink B. *Granuloma formation in pulmonary sarcoidosis // Front Immunol. 2013. Vol. 4:437. P. 1-9.* 4. Sakthivel P, Bruder D. *Mechanism of granuloma formation in sarcoidosis // Curr Opin Hematol. 2017. Vol. 24. № 1. P. 59-65.*

УДК 62.37.41

## **ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЁЛОГО ПСОРИАЗА НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 (ИЛ-36РА) ЧЕЛОВЕКА**

**Колобов А.А., Кондратьева Е.В., Кудлинг Т.В., Протасов Е.А., Калинин Р.С., Нибирицкий П.П., Александров Г.В., Петров А.В., Симбирцев А.С.**

ФГУП "Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов" ФМБА РФ,  
Санкт-Петербург, Россия  
alexey.kolobov.spb@gmail.com

Разработана технология получения рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 (ИЛ-36РА) и успешно завершены доклинические испытания его эффективности и безопасности в качестве лекарства для лечения генерализованного пустулезного псориаза и других дерматитов. Препарат готов к клиническим испытаниям.

**Ключевые слова:** интерлейкин-36, ИЛ-36, рецепторный антагонист интерлейкина-36, ИЛ-36РА, рекомбинантный белок, псориаз

Рецепторный антагонист интерлейкина-36 (ИЛ-36РА) – противовоспалительный цитокин, специфичный для кожных покровов. Ряд мутаций в гене ИЛ-36РА ассоциирован с развитием хронического кожного воспаления, в частности тяжелой формы псориаза – генерализованного пустулезного псориаза (ГПП). Используемые сейчас для лечения ГПП препараты являются системными иммуносупрессорами и часто вызывают осложнения при лечении. Введение экзогенного ИЛ-36РА может быть более специализированным подходом к лечению ГПП и других дерматитов.

Целью данной работы стала разработка метода получения рекомбинантного ИЛ-36РА человека в масштабе пилотного промышленного производства и проведение доклинических исследований эффективности и безопасности лекарственного средства для лечения псориаза на его основе.

Поскольку для полной биологической активности ИЛ-36РА необходимо отщепление инициаторного остатка метионина, нами был создан штамм-продуцент на основе *E. coli*, несущий плазмиды с генами ИЛ-36РА человека и метионинаминопептидазы (МАП) *E. coli*. Разработана методика его культивирования в ферментерах объёмом до 250 л и схема двухстадийной неафинной хроматографической очистки. Разработанная методика позволяет получать в результате одного производственного цикла до 10 г очищенного ИЛ-36РА с содержанием менее 5% его формы с неотщеплённым N-концевым остатком метионина.

Разработана композиция готовой лекарственной формы ИЛ-36РА в виде раствора для подкожного введения. Успешно завершены доклинические испытания эффективности и безопасности полученного ИЛ-36РА в качестве лекарства для лечения псориаза. Препарат эффективно купирует воспаление в модели индуцированного имихимодом псориазоподобного дерматита на мышах в дозе 0,05 – 0,25 мг/кг при подкожном введении. При этом он не токсичен для грызунов и зайцеобразных в дозах до 200 мг/кг. Препарат апирогенен, не обладает тератогенным эффектом, не оказывает местно-раздражающего действия, не обладает хронической и репродуктивной токсичностью, иммунотоксичностью.

Таким образом, препарат для лечения псориаза на основе ИЛ-36РА эффективно купирует кожное воспаление и не токсичен в дозах, в тысячи раз превосходящих расчетную терапевтическую дозу для человека (100 микрограмм/кг). Препарат готов к клиническим испытаниям.

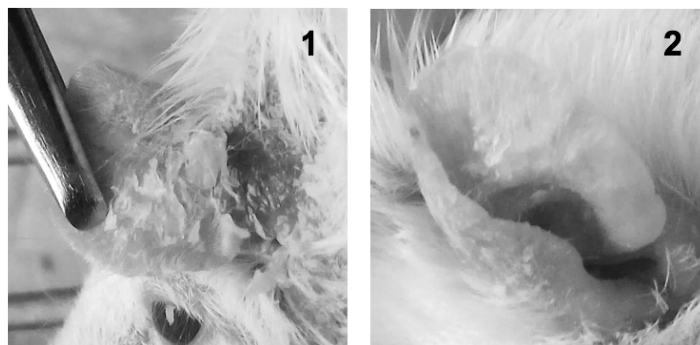


Рисунок 1. Уши мышей после пяти дней обработки имихимидом на фоне введения подкожно в холку физиологического раствора (1) и ИЛ-36РА (2).

UDC 62.37.41

## THERAPY FOR SEVERE PSORIASIS BASED ON RECOMBINANT INTERLEUKIN-36 RECEPTOR ANTAGONIST

**Kolobov A.A., Kondratyeva E.V., Kudling T.V., Protasov E.A., Kalinin R.S., Nimiritsky P.P., Alexandrov G.V., Petrov A.V., Simbirtsev A.S.**

*State research institute of Highly Pure Biopreparations, Saint-Petersburg, Russia  
 alexey.kolobov.spb@gmail.com*

We developed the technology of recombinant human interleukin-36 receptor antagonist (IL-36Ra) production and finished its preclinical trials as a therapy for generalized pustular psoriasis and other dermatitis. The drug is ready for clinical trials.

Keywords: interleukin-36, IL-36, interleukin-36 receptor antagonist, IL-36Ra, recombinant protein, psoriasis

Interleukin-36 receptor antagonist (IL-36Ra) is a skin-specific anti-inflammatory cytokine. Several mutations in its gene are associated with development of the most severe form of psoriasis – generalized pustular psoriasis (GPP). Drugs currently used for GPP therapy act as systemic immunosuppressors and often cause complications. Administration of exogenous IL-36Ra could be a more targeted approach to therapy of GPP and other dermatitis.

The aim of this work was the development of recombinant human IL-36Ra pilot-scale production method and preclinical trials of IL-36Ra effectiveness and safety as a treatment for psoriasis.

As the cleavage of initiator methionine residue from IL-36Ra is necessary for its full biological activity we created an *E. coli* producer strain carrying plasmids with genes coding human IL-36Ra and *E. coli* methionineaminopeptidase. We developed a method of this strain cultivation in bioreactors with volume up to 250 L and consequent 2-step chromatographic purification of IL-36Ra. Up to 10 g of purified IL-36Ra with less than 5% of its unprocessed form can be produced in single technological cycle using this method.

We developed the IL-36Ra drug formulation as a solution for subcutaneous injection. The preclinical studies of IL-36Ra effectiveness and safety as a treatment for psoriasis are now successfully finished. Subcutaneous injections of 0,05 – 0,25 mg/kg IL-36Ra effectively decrease the inflammation in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis model on mice. At the same time the drug is not toxic for rodents and rabbits in doses up to 200 mg/kg. It's apirogenic, nonteratogenic, not irritating, have no chronic or reproductive toxicity or immunotoxicity.

The anti-psoriasis drug based on IL-36Ra effectively decreases the skin inflammation and is not toxic in doses thousands times higher than predicted therapeutic dose in humans (100 micrograms/kg). The drug is ready for clinical trials.

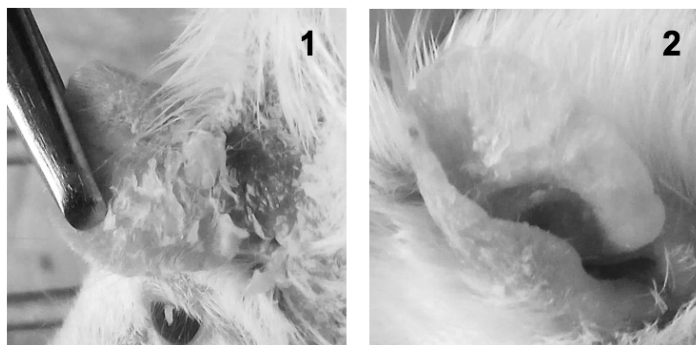


Figure 1. Ears of mice after 5 days of imquimod application subcutaneously administered with saline (1) or IL-36Ra (2).

УДК 615.373

## ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК ДЛЯ ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Лебедев Л.Р., Ермолаев В.В., Скарнович М.О., Скарнович М.А., Шишкина Л.Н., Даниленко Е.Д.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, пос. Кольцово Новосибирской обл., Россия

Разработаны технологии для получения субстанций препаратов интерферонов и– двуспиральной РНК бактериофага фб - индуктора интерферонов. На их основе созданы композиции для экстренной профилактики и лечения вирусных инфекций.

**Ключевые слова:** интерфероны, инфекционные заболевания, профилактика

Двуспиральные РНК (дсРНК) с молекулярной массой более 1000 п.о. являются индукторами интерферонов «раннего типа» (синтез последних детектируется через 3 – 6 ч после введения). Очевидно, что при угрозе инфицирования важна более быстрая мобилизация иммунной системы. По-видимому, ускорения ответа можно достигнуть в результате получения композиционных препаратов, содержащих, помимо дсРНК, белки-интерфероны, пик активности которых приходится на первые часы после введения.

В Институте медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» разработаны технологии получения субстанций препаратов: 1) дсРНК бактериофага фб, которая состоит из осаждения фага в 10%-ном растворе ПЭГ, его лизиса и очистки дсРНК фракционированием в растворах LiCl с последующей гель-хроматографией на сефарозе CL-6B и 2) интерферонов, которые включают дезинтеграцию клеток-продуцентов, отмывку тел включения, экстракцию из последних целевых белков растворами солюбилизующих агентов, очистку их хроматографическими методами и ренатурацию.

На основе этих субстанций созданы композиции, сочетающие рекомбинантные интерфероны человека (интерферон альфа-2в и/или интерферон-гамма) и дсРНК бактериофага фб. Показано, что в растворе молекулы образуют комплексы за счет отрицательного заряда РНК и положительных зарядов белков. Подвижность комплексов при электрофорезе в геле агарозы снижается при увеличении содержания белков по отношению к дсРНК в составе композиций.

В сравнительных исследованиях комплексного препарата дсРНК с интерфероном-альфа-2в и препарата дсРНК на лабораторных животных было показано, что композиция обладала более выраженной противовирусной активностью в отношении вируса гриппа. Коэффициент защиты мышей после интраназального введения препарата дсРНК с ИФН-альфа-2в и последующего заражения вирусом гриппа A/Aichi (H3N2) возрос по сравнению с препаратом дсРНК и составлял 41%. Аналогичные данные были получены при внутрибрюшинном введении композиции мышам, инфицированным вирусом гриппа A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1). Коэффициент защиты животных после внутрибрюшинного введения композиционного препарата составлял 40%, что было сравнимо по эффективности с показателем препарата Тамифлю.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки комплексных препаратов на основе дсРНК бактериофага фб и белков-интерферонов новых лекарственных средств для экстренной профилактики и лечения вирусных инфекций.



UDC 615.373

## PREPARATIONS BASED ON DOUBLE STRANDED RNA FOR EMERGENCY PREVENTION OF INFECTIOUS DISEASES

Lebedev L.R., Ermolayev V.V., Scarnovich M.O., Scarnovich M.A., Shishkina L.N., Danilenko E.D.

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Technologies for the obtaining of substances of interferon preparations and preparations of double-stranded RNA of bacteriophage  $\phi 6$  - an interferon inducer have been developed. On their basis, compositions for emergency prevention and treatment of viral infections have been created.

**Key words:** interferons, infectious diseases, prevention

Double-stranded RNAs (dsRNAs) with a molecular weight of more than 1000 bp. are interferon inducers of the "early type" (the synthesis of the latter is detected 3-6 hours after administration). Obviously, with the threat of infection, much faster mobilization of the immune system is particularly important. Apparently, the acceleration of the immune response can be achieved as a result of the obtaining of composition preparations containing, in addition to dsRNA, interferon proteins, the peak activity of which falls on the first hours after administration.

In the Institute of Medical Biotechnology of the SRC VB Vector there has been developed the technologies for obtaining the substances of preparations: 1) of dsRNA of bacteriophage  $\phi 6$ , including phage precipitation in 10% PEG solution, its lysis and purification of dsRNA by fractionation in LiCl solutions followed by gel chromatography on Sepharose CL-6B and 2) of interferons including producer cells disintegration, inclusion bodies washing, extraction from the last target proteins by solutions of solubilizing agents, purification by chromatography and renaturation.

On the basis of these substances, there have been created compositions combining recombinant human interferons (interferon alfa-2b and / or interferon-gamma) and dsRNA of bacteriophage  $\phi 6$ . It has been shown that in the solution the molecules form complexes due to a negative charge of RNA and positive charges of proteins. The mobility of the resulting complexes under electrophoresis in agarose gel slows with the increase in the protein content as related to dsRNA in the composition.

In comparative studies of the complex preparation of dsRNA with interferon alfa-2b and the preparation of dsRNA in laboratory animals, it was shown that the composition had more pronounced antiviral activity against the influenza virus. The mice protection coefficient after intranasal administration of the combination of dsRNA with interferon alfa-2b and subsequent infection with the A / Aichi (H3N2) virus increased compared with dsRNA preparation and was 41%. Similar data were obtained by intraperitoneal administration of the composition to mice infected with the influenza A / Chicken / Kurgan / 05/2005 (H5N1) virus. The coefficient of animal protection after intraperitoneal administration of the composition preparation was 40%, which was comparable in effectiveness to that of Tamiflu.

The obtained data testify to the prospects of further development of complex preparations based on dsRNA of bacteriophage  $\phi 6$  and interferon proteins for emergency prevention and treatment of viral infections.

УДК 571.27

## ПРИМЕНЕНИЕ ИНТЕРФЕРЕНЦИИ РНК ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПОДХОДОВ К АНТИЦИТОКИНОВОЙ ТЕРАПИИ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р., Камышников О.Ю., Иванова А.С., Хаитов М.Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия  
 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24. e-mail: ip.shilovski@nrcki.ru

Созданный комплекс siIL-4/LTR, состоящий из молекул миРНК против гена il-4 и пептида-носителя, при ингаляционном введении животным снижает признаки аллергической бронхиальной астмы, такие как степень воспаления в легких (на 30-40%) и гиперреактивность бронхов (на 20%).

**Ключевые слова:** астма, воспаление, РНК-интерференция экспрессия генов.

Бронхиальная астма (БА) – хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей. Распространенность БА может достигать 18%. Существующей терапии недостаточно ввиду продолжающегося роста заболеваемости, поэтому разработка новых способов лечения продолжает оставаться актуальной задачей. Провоспалительный цитокин IL-4 обеспечивает формирование основных признаков патологии: синтез IgE-антител, гиперреактивность бронхов (ГРБ), инфильтрация эозинофилов в ткань легких. К настоящему моменту создан ряд препаратов на основе моноклональных антител против IL-4 [4]. Однако использование технологии на основе РНК-интерференции является наиболее перспективным [2]. Главная цель работы состояла в создании иммунобиологического комплекса (siIL4/LTP), состоящего из молекул миРНК против гена il-4 [1] и катионного пептидного носителя для терапии аллергической БА.

**Методы.** Использовали модель БА у мышей [3]. Мыши-самки BALB/c иммунизировали внутрибрюшинно 20 мкг аллергена овальбумина (OVA) и 2 мг Al(OH)<sub>3</sub> в дни 0, 14, 28 с последующей интраназальной провокацией 50 мкг раствора OVA (10 мг/мл) в дни 41-43. В дни 37-43 мыши обрабатывались аэрозольно комплексом siIL4/LTP (доза 88 мкг). В качестве отрицательного контроля использовали комплекс siGFP/LTP, который содержит неспецифическую молекулу миРНК против гена gfp. Уровни специфических антител классов IgE, IgG2a, IgG1 в сыворотке крови определяли методом ИФА. ГРБ определяли с помощью неинвазивной плетизмографии в день 44. Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) собирали в день 45 и анализировали его состав методом световой микроскопии. Левое легкое использовали для гистологического анализа. Клетки БАЛ лизировали и определяли уровень IL-4 методом RT-PCR.

**Результаты.** В результате мыши, получавшие siIL4/LTP, демонстрировали снижение на 30% уровня экспрессии IL-4 в клетках БАЛ в сравнении с мышами, получавшими siGFP/LTP. Несмотря на подавление IL-4 уровни специфических антитела класса IgE, IgG2a и IgG1 не изменялись. ГРБ у мышей, получавших siIL4/LTP, была снижена на 20% по сравнению с группой мышей, обработанных siGFP/LTP. Введение siIL-4/LTP снижало инфильтрацию эозинофилов в БАЛ на 38%, что свидетельствует о снижении степени аллергического воспаления в легких. Гистологический анализ подтвердил противовоспалительный эффект ингаляций siIL4/LTP, что выражалось в снижении гиперплазии эпителия бронхов.

**Заключение.** Семикратное аэрозольное введение комплекса siIL-4/LTP подавляет экспрессию целевого гена il-4 и тем самым нивелирует аллергическое воспаление в легких и ГРБ на модели аллергической БА у мышей, что является перспективным подходом для терапии этого заболевания.

#### Литература:

1. Шиловский И.П., Мазуров Д.В., Шершакова Н.Н. и др. Синтетические siRNA эффективно подавляют экспрессию провоспалительного цитокина интерлейкина-4 мыши *in vitro* // Иммунология. -2012. № 22. -С. 66–70.
2. Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р. и др. Интерференция РНК - новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы // Экспериментальная и клиническая фармакология. -2016. -№ 4 (79). -С. 35–44.
3. Shilovskiy I.P., Babakhin A.A., Shershakova N.N. et al. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice // *Current trends in immunology*. 2015. No16. P. 79–91.
4. Shilovskiy I.P., Eroshkina D.V., Babakhin A.A. et al. Anticytokine therapy of allergic asthma // *Molecular Biology*. 2017. No 1 (51). P. 1–13.

УДК 571.27

## TARGETING TO IL-4 GENE VIA RNA INTERFERENCE AS A NOVEL APPROACH FOR ANTICYTOKINE THERAPY OF BRONCHIAL ASTHMA

Shilovskiy I.P., Sundikova M.S., Gaisina A.R., Kamyshnikov O.Y., Ivanova A.S., Khaitov M.R.

National Research Center - Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation  
115478, Russia Federation, Moscow, Kashirskoe shosse 24.  
e-mail: ip.shilovski@nrcki.ru

Aerosol treatment of mice with the complex siIL-4/LTP, consisted of siRNA targeted to il-4 gene and cell penetrating peptide significantly decrease the main features of allergic asthma: allergic inflammation in lungs by 30-40% and airway hyperreactivity by 20%.

Bronchial asthma (BA) is a chronic inflammatory pulmonary disease. The prevalence of BA in different countries can reach 18%. The existing BA therapy is not sufficient due to the continuing increase in it's morbidity, therefore the development of novel methods of BA treatment remains an urgent task. Recent studies used modern methods discovered that IL-4 gene play one of a key role in BA pathogenesis. There are many novel drugs based on monoclonal antibodies are developed against IL-4 [4]. However, the use of RNA interference technology could be

more promising in terms of efficiency and economic feasibility [2]. Therefore, the goal of this study was development of the complex of miRNA against the il-4 gene [1] and a cationic peptide carrier for the treatment of BA.

**Methods.** The study of the complex was performed using mouse model of allergic asthma [3]. BALB/c mice were i.p. sensitized with ovalbumin (OVA) (20 µg/mouse) emulsified in Al(OH)<sub>3</sub> (2 mg/mouse) on days 0, 14, 28 and challenged by i.n. administrations of 50 µl/mouse OVA solution (10 mg/ml) on days 41-43. Then mice were treated with repeated exposures (days 37-43) to nebulized siIL4/LTP (dose 88 µg/mouse). Aerosol exposure with siGFP/LTP complex, which did not influence upon IL-4 expression in vitro served as a negative control. Serum levels of anti-OVA IgE, IgG2a, IgG1 antibodies were measured by ELISA. Airway hyper-responsiveness (AHR) to methacholine was measured by non-invasive plethysmography on day 44. Bronchoalveolar lavage (BAL) collected on day 45 was analyzed by light microscopy. Left lung was removed for histological analysis. The levels of IL-4 expression in BAL cells were evaluated by RT-PCR.

**Results.** Mice treated with siIL4/LTP complex demonstrated a 30% reduction of IL-4 expression in BAL cells compared to siGFP/LTP treated mice. In spite of down regulation of IL-4 expression, the levels of OVA-specific IgE, IgG2a and IgG1 were similar in both groups, which received siGFP/LTP and siIL4/LTP complexes that may be due to a local action of aerosol delivered siIL4/LTP. The AHR in mice treated with siIL4/LTP was significantly decreased (by 20%) compared to siGFP/LTP treated mice. Analysis of cell composition of BAL collected from mice treated with siIL-4/LTP demonstrated the decrease of eosinophil infiltration (by 38%) indicating that the siIL4/LTP complex inhibit allergic inflammation in lungs. Histological analysis of lung tissue in mice treated with siIL4/LTP confirmed the decrease of allergic inflammatory response expressed in reduction of goblet cell hyperplasia, peribronchial and perivascular eosinophil, neutrophil and lymphocyte infiltration.

**Conclusion.** From this study we can conclude that, aerosol administration of siIL-4/LTP complex before and during allergen challenge inhibits of allergic airway inflammation and AHR in a mouse model of BA that is a promising approach for anticytokine therapy of BA.

#### References:

1. Shilovskiy I.P., Mazurov D.V., Shershakova N.N. et al. siRNA suppresses the expression of murine proinflammatory interleukine-4 in vitro // *Immunologiya*. 2012. No22. P. 66–70.
2. Shilovskiy I.P., Sundukova M.S., Gaisina A.R. et al. RNA Interference: new approach to the treatment of allergic asthma // *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2016. No4. . 35–44.
3. Shilovskiy I.P., Babakhin A.A., Shershakova N.N. et al. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice // *Current trends in immunology*. 2015. No16. P. 79–91.
4. Shilovskiy I.P., Eroshkina D.V., Babakhin A.A. et al. Anticytokine therapy of allergic asthma // *Molecular Biology*. 2017. No 1(51). P. 1–13.

УДК 57.088.1

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ТОТАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ДЕФЕНСИНОВ КРЫСЫ

**Андреева Е.А.<sup>1</sup>, Янкелевич И.А.<sup>1,2</sup>, Алешина Г.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация  
 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А  
 E-mail: Katya.Andreeva@pharminnotech.com

Для полученной в высокоочищенном виде фракции поликлональных антител к дефенсинам крысы RatNP-1, RatNP-2, RatNP-3 и RatNP-4 подбираются параметры конъюгации с флуоресцентным красителем BODIPY FL NHS Ester.

**Ключевые слова:** дефенсины, поликлональные антитела, BODIPY FL NHS Ester.

Дефенсины – это катионные низкомолекулярные полипептиды, обладающие широким спектром антибиотического действия и разнообразными иммуномодулирующими свойствами, связывающими врожденный и приобретенный иммунитет. Гены дефенсинов экспрессируются во многих тканях растений, членистоногих, моллюсков, амфибий, рыб, птиц, млекопитающих и человека, где регулируют секрецию различных цитокинов [1, 2].

Недавние исследования показали, что экзогенные дефенсины крысы оказывают стимулирующее влияние на экспрессию генов препроорексина в нейронах гипоталамуса крыс в условиях холодового стресса [3]. Однако до сих пор не изучено распространение эндогенных дефенсинов в тканях мозга, что необходимо для полного понимания их физиологических функций и регуляции активности.

Для изучения локализации и функций пептидных молекул широко используются флуоресцентные метки, конъюгированные с антителами. Наиболее популярным инструментом конъюгирования красителя с белком или антителом является сукцинимидил сложный эфир флуорофора BODIPY. Полученные с его помощью конъюгаты проявляют яркую флуоресценцию, имеют узкие полосы пропускания излучения и относительно длительные периоды жизни возбужденного состояния. Они могут быть использованы для всевозможных методов анализа анизотропии флуоресценции при решении большого диапазона аналитических и диагностических задач, а именно: конфокальная и двухфотонная микроскопии, иммунофлуоресцентный анализ, иммуноблоттинг и др.

Работа по получению флуоресцентных антител к тотальной фракции дефенсинов крысы состоит из трех этапов:

1. Выделение и очистка тотальной фракции дефенсинов крысы.
2. Получение поликлональных антител к дефенсинам в высокоочищенном виде.
3. Конъюгация полученных антител с BODIPY FL NHS Ester.

В результате работы по первым двум этапам получена фракция поликлональных антител в высокоочищенном виде с общим содержанием IgG 3 мг.

Для высокой степени сшивки иммуноглобулинов с флуоресцентным красителем эмпирически подбираются следующие параметры:

1. Концентрация поликлональных антител.
2. Значение pH буферного раствора для антител.
3. Молярное соотношение красителя и антител.

В дальнейшем полученные флуоресцентные антитела к тотальной фракции дефенсинов крысы планируется использовать для изучения их локализации в тканях экспериментальных животных.

#### Литература:

1. A Novel Role for Defensins in Intestinal Homeostasis: Regulation of IL-1  $\beta$  Secretion / S. Jishu [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 1245-1253.
2. Differential effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells / N. Sakamoto [et al.] // *Am. J. Physiol. – Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. L508-L513.
3. Спирина Н.В., Изучение влияния дефенсинов на уровень синтеза препроорексина в нейронах гипоталамуса крыс в условиях комбинированного эмоционально-физиологического стрессорного воздействия / Н.В. Спирина, В.А. Пугач, И.А. Янкевич // *Инновации в здоровье нации: тезисы докл. Всерос. конф. (Санкт-Петербург, 8-9 ноября 2017 г.)* – СПб, 2017. – С. 35-38.

UDC: 57.088.1

## DEVELOPMENT OF FLUORESCENT POLYCLONAL ANTIBODY AGAINST TOTAL FRACTION OF RAT DEFENSINS

Andreeva E.A. <sup>1</sup>, Yankelevich I.A. <sup>1,2</sup>, Aleshina G.M. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation  
197376, St. Petersburg, Professor Popov str., 14A  
E-mail: Katya.Andreeva@pharminnotech.com

For the polyclonal antibodies against rat defensins RatNP-1, RatNP-2, RatNP-3 and RatNP-4, the conjugation parameters with BODIPY FL NHS Ester fluorescent dye are selected.

**Key words:** defensins, polyclonal antibody, BODIPY FL NHS Ester.

Defensins are a family of small cationic peptides that have a broad spectrum of antibiotic effect and a variety of immunomodulatory activity linking innate and acquired immunities. Multiple defensin peptides are expressed in most tissues throughout the body and have been found in many tissues of plants, arthropods, mollusks, amphibians, fish, birds, mammals and humans, where the secretion of various cytokines is regulated [1, 2].

Recent studies have shown that exogenous rat defensins stimulate the expression of preproorexin in rat hypothalamus neurons in conditions of cold stress [3]. However, the localization of endogenous defensins in the brain tissue is still not explored, which is necessary for a complete understanding of their physiological functions and regulation of activity.

To study the localization and functions of peptides and proteins, fluorescent dye conjugated with antibody are widely used. The NHS ester (or succinimidyl ester) of BODIPY FL is the most popular tool for conjugating the dye to a protein or antibody. The resulting BODIPY FL conjugates exhibit bright fluorescence, narrow emission bandwidths, and relatively long excited-state lifetimes, which can be useful for fluorescence polarization assays and two-photon excitation microscopy.

Development of fluorescent polyclonal antibody against total fraction of rat defensins consists of three stages:

1. Isolation and purification of the total fraction of rat defensins.
2. Obtaining of polyclonal antibodies against defensins in highly purified form.
3. Conjugation of antibodies with BODIPY FL NHS Ester.

As a result of the first two stages, the polyclonal antibodies against defensins were obtained in a highly purified form with the total IgG content of 3 mg.

For a high degree of cross-linking of immunoglobulins with a fluorescent dye, the following parameters are empirically selected:

1. Concentration of polyclonal antibodies.
2. pH value of buffer solution for antibodies.
3. The molar ratio of the dye to antibodies.

Subsequently it is planned to be used the fluorescent antibodies against total fraction of rat defensins in study their localization in tissues of experimental animals.

#### References:

1. A Novel Role for Defensins in the Intestinal Homeostasis: Regulation of IL-1  $\beta$  Secretion / S. Jishu [et al.] // *J. Immunol.* - 2007. - Vol. 179. - P. 1245-1253.
2. Differential effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells / N. Sakamoto [et al.] // *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* - 2005. - Vol. 288. - P. L508-L513.
3. Spirina N.V., Study of the influence of defensins on the level of synthesis of preproorexin in the rat's hypothalamus neurons in conditions of combined emotional-physiological stress influence / N.V. Spirina, V.A. Pugach, I.A. Yankelevich // *Innovations in the health of the nation: theses dokl. Vseros. Conf. (St. Petersburg, November 8-9, 2017)* - St. Petersburg, 2017. - P. 35-38.

УДК 578.282

## РАЗРАБОТКА МОЛЕКУЛ МИРНК ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ РЕСПИРАТОРНОГО СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА ЧЕЛОВЕКА

Илюхина А.А., Шиловский И.П., Вишнякова Л.И., Гайсина А.Р., Хаитов М.Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия  
 115478, Москва, Каширское шоссе, дом 24  
 e-mail: aa.ilyukhina@nrcii.ru

В данной работе мы спроектировали две молекулы миРНК против генов п и р респираторного синцитиального вируса и в экспериментах *in vitro* показали выраженную противовирусную активность.

**Ключевые слова:** миРНК, респираторный синцитиальный вирус, интерференция РНК

В России ежегодно регистрируется от 27,3 до 41,2 млн. случаев острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), которые составляют до 90% всех инфекционных заболеваний. Респираторный синцитиальный вирус занимает одну из лидирующих позиций в структуре ОРВИ. Высокая изменчивость генома вируса, а также отсутствие действенных вакцин вынуждают искать новые способы борьбы с РСВ. Одним из перспективных подходов к разработке противовирусных средств является использование недавно открытого явления интерференции РНК [1]. Под интерференцией РНК понимается процесс негативной регуляции генов посредством молекул малых интерферирующих РНК (миРНК). Таким образом, целью данной работы было создание молекул миРНК, направленных против консервативных регионов в геноме РСВ и изучение их противовирусных свойств в экспериментах *in vitro*.

С помощью программного обеспечения OligoWalk были спроектированы последовательности молекул миРНК против константных участков генома РСВ - генов *n* и *p*. Из более чем 50-ти вариантов было синтезировано 4 варианта молекул миРНК. В качестве контроля использовали молекулы миРНК против гена *gfp*. В качестве тест-системы для оценки противовирусной эффективности молекул миРНК использовали клетки Hep-2. Доставка миРНК в клетки осуществлялась с помощью коммерческого реагента Lipofectamine2000 (Invitrogen). Инфекция клеток РСВ при MOI=0,1 осуществлялась через 4 часа после проведения трансфекции. Вирусная нагрузка оценивалась методом титрования на монослое клеток МА-104 и методом количественной ПЦР на третьи сутки после инфекции.

Было осуществлено проектирование и синтез молекул миРНК против консервативных генов РСВ; гена *n* (варианты миРНК: siN745, siN976), кодирующего фосфопротеин, защищающий геномную РНК в цитоплазме клеток; и гена *p* (варианты миРНК: siP2 и siP4) [2], кодирующего субъединицу фермента репликации вирусного генома. Методом количественной ПЦР было установлено снижение вирусной нагрузки в 10 раз при применении молекул миРНК siP4 и siN745. Данные, полученные при титровании супернатантов на монослое клеток МА-104, подтвердили результаты, полученные методом количественной ПЦР, показав снижение титра вируса в 5-10 раз. Поскольку гены *p* и *n* необходимы для различных этапов жизненного цикла вируса, то целесообразно было изучить указанные молекулы миРНК (siP4 и siN745) при их одновременном использовании. В результате было показано, что одновременное применение молекул миРНК против обоих генов-мишеней приводит к почти 100-кратному снижению вирусной нагрузки в клетках Hep-2.

Осуществлен дизайн молекул миРНК против генов *n* и *p*, необходимых для репликации вируса РСВ в клетке и показан их противовирусный биологический эффект в экспериментах *in vitro*. Данные миРНК в дальнейшем могут быть использованы в составе противовирусных лекарственных средств. Работа поддержана грантом РФФИ № 17-34-80170.

#### Литература:

1. Хаитов М.Р., Литвин Л.С., Шиловский И.П., Башкатова Ю.Н., Файзулов Е.Б., Зверев В.В., Интерференция РНК. Новые подходы к разработке противовирусных препаратов // Иммунология. -2010. -Т. 31. № 2. - С. 69-76.
2. Шиловский И.П., Мазуров Д.В., Хаитов М.Р., Разработка векторных конструкций для сайленсинга *p*-гена респираторного синцитиального вируса // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. -2010. № 4. - С. 11-16.

UDC 578.282

## DEVELOPMENT OF SIRNA MOLECULES FOR THE SUPPRESSION OF HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

Ilyukhina A.A., Shilovskiy I.P., Vishnyakova L.I., Gaisina A.R., Khaitov M.R.

National Research Center - Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation  
115478, Russia Federation, Moscow, Kashirskoe shosse 24.  
e-mail: aa.ilyukhina@nrccii.ru

In this study, we have developed two variants of siRNA molecules targeted to genes *n* and *p* that are crucial for replication of respiratory syncytial virus. Developed siRNAs effectively reduce virus replication *in vitro*.

**Key words:** siRNA, respiratory syncytial virus, RNA interference

Every year in Russia, from 27.3 to 41.2 million cases of ARVI are registered, which constitute up to 90% of all infectious diseases. Respiratory syncytial virus (RSV) is a big problem for medicine, being the main cause of acute respiratory viral infections (ARVI). The high variability of the genome of the virus, as well as the lack of effective vaccines, makes it necessary to search for new medicines to combat RSV. One of the promising approach to develop of novel anti-infective drugs is the recently discovered method of RNA interference [1]. RNA interference is the process of negative regulation of gene expression by small interfering RNA molecules (siRNA). Therefore, the aim of this study was to design of siRNA molecules targeted to conservative regions of RSV genome and to study their antiviral properties *in vitro*.

Using the OligoWalk software, siRNA sequences were designed against the constant sites of the RSV genome, the *n* and *p* genes. Out of more than 50 variants, four variants of siRNA molecules were synthesized. As a control of the sequence-specific action in the experiments, siRNA against *gfp* gene was used. Hep-2 cell line was used as the model of RSV-replication *in vitro* to evaluate antiviral effect of siRNA molecules. Delivery of siRNAs to the cells was carried out by the method of transfection using reagent Lipofectamine2000 (Invitrogen). Hep-2 cells

were transfected with siRNAs followed by infection with RSV at MOI = 0.1 which was performed 4 hours after transfection. Viral load was assessed by titration on the monolayer of MA-104 cells and by quantitative PCR.

Design and synthesis of siRNAs targeted to genes n and p of RSV was carried out. Variants siN745 and siN976 targeted to gene n encoding a phosphoprotein protected genomic viral RNA in the cytoplasm. Variants siP2 and siP4 [2] targeted to gene p encoding the subunit of the viral genome replication enzyme. Quantitative PCR analysis revealed 10-fold decrease in the viral load when using siP4 and siN745 molecules. The data obtained by titration method confirmed these results obtained by quantitative PCR, showing a 5-10-fold decrease in the virus titer. Genes p and n are necessary for different stages of the RSV life cycle. Therefore, it was interesting to investigate whether the combination of siP4 and siN745 will be more efficient in RSV downregulation than the use of both variants individually? We have shown that simultaneous application of these siRNAs resulted in almost 100-fold decrease in the viral load in Hep-2 cells.

The design of siRNA molecules against p and n genes which are necessary for RSV replication was performed and their antiviral effect in vitro was demonstrated. Developed siRNAs can be used as part of antiviral drugs. The study was supported by RFBR grant No 17-34-80170.

#### References:

1. Khaitov M.R., Litvin L.S., Shilovskiy I.P., Bashkatova Yu.N., Faizuloev E.B., Zverev V.V. RNA interference. New approaches to the development of antiviral agents. // *Immunologiya*. -2010. -V. 31. No 2. -P. 69-76.
2. Shilovskiy I.P., Mazurov D.V., Khaitov M.R. The development of vector constructions for respiratory syncytial virus (RSV) P-gene silencing // *Journal of Pathophysiology and Experimental Therapy*. 2010. No 4. - P. 11- 16.

УДК: 57.088.1, ББК: 28.074

## РАЗРАБОТКА НОВОГО СПОСОБА НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАННИХ СТАДИЙ РАЗВИТИЯ НЕЙРОБЛАСТОМЫ НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННОГО ГАНГЛИОЗИДА GD2

И.И.Доронин <sup>1</sup>, И.В.Холоденко <sup>1</sup>, Т.В.Шаманская <sup>2</sup>, С.М.Деев <sup>1</sup>, Р.В.Холоденко <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук; ООО «Реал Таргет», Россия, 117997, Москва, Миклухо-Маклая, 16/10, doroninii@gmail.com, +79197223808

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 117997, Москва, Саморы Машела, 1,

Предложен новый способ определения опухолеассоциированного ганглиозида GD2 в сыворотке крови онкологических пациентов для диагностики ранних стадий развития GD2-позитивных опухолей, в частности, нейробластомы, с использованием метода иммуноферментного анализа. Показана преимущественная локализация ганглиозида GD2 в комплексах с липопротеинами низкой плотности, а также достаточная чувствительность методики иммуноферментного анализа для качественного и количественного определения уровня ганглиозида GD2, что позволяет внедрить в клиническую практику доступные тест-системы для ранней диагностики GD2-позитивных онкологических заболеваний.

**Ключевые слова:** Ганглиозиды, GD2, иммуноферментный анализ, ранняя диагностика нейробластомы.

В настоящее время во всем мире идет активный поиск опухолеассоциированных маркеров, определение уровня которых позволит правильно диагностировать онкологическое заболевание и выбрать оптимальный вариант лечения. В последние годы показано, что такими маркерами могут служить не только белки, но и гликофинголипиды, в частности ганглиозид GD2, который гиперэкспрессируется на многих типах рака, составляющих порядка 10% от общего числа онкологических заболеваний, включая нейробластому, саркомы мягких тканей, остеосаркомы, мелкоклеточный рак легких, глиомы, ретинобластомы, меланому, некоторые лимфомы, а также ряд других опухолей. Феномен сброса специфических онкоассоциированных ганглиозидов в кровь, где они циркулируют в составе сложных комплексов с белками [1], потенциально позволяет количественно определить уровень ганглиозида и соотнести его со стадией развития GD2-позитивного онкологического заболевания, и соответственно, выбрать оптимальную схему терапии. Однако, несмотря на бурное развитие методов иммунотерапии GD2-позитивных онкологических

заболеваний [2], доступных способов диагностики данного онкомаркера в клинической практике в настоящее время не представлено. При этом следует отметить, что активный сброс GD2 начинается на ранних стадиях развития опухолей, что делает его удобным диагностическим маркером для раннего скрининга GD2-позитивных онкологических заболеваний. В настоящее время для качественного и количественного определения уровня ганглиозидов исходя из анализа мировой литературы можно использовать методы масс-спектрометрии, тонкослойной хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии, однако они сложны в применении в диагностической лаборатории, не оснащенной специальным оборудованием и реактивами и не являются общедоступными.

В ходе проведенной работы были изучены различные способы выделения фракций липопротеинов крови, с которыми ассоциирован ганглиозид GD2, выбраны оптимальные методы сорбции на различных типах подложек, а также сформулированы критерии отбора оптимального способа определения целевого антигена, характеризующиеся минимальными потерями ганглиозидов GD2 в ходе проведения анализа. Показано, что в сыворотке крови ганглиозид GD2 преимущественно ассоциирован с липопротеинами низкой плотности и такое комплексообразование может быть использовано как для концентрирования ганглиозидов GD2, так и для применения в ИФА.

Разработанная методика позволяет получить данные об уровне циркулирующего ганглиозидов GD2, что было показано как на модельной сыворотке человека с экзогенно внесенным ганглиозидом GD2, так и на сыворотке пациентов с нейробластомой, которая гиперэкспрессирует ганглиозид GD2. Таким образом, разрабатываемая технология после клинической валидации позволит внедрить в клиническую практику различные тест-системы, позволяющие достоверно определять уровень ганглиозидов GD2 и своевременно подбирать оптимальную схему лечения онкологических заболеваний, с трудом поддающихся классическим методам терапии.

#### Литература:

1. Valentino L., Moss T., Olson E., Wang H.J., Elashoff R., Ladisch S. Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. // *Blood*, 1990. v. 75(7): p. 1564-1567.
2. Kholodenko R.V., Kalinovskiy D.V., Doronin I.I., Ponomarev E.D., Kholodenko I.V. Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations. // *Curr Med Chem*. 2017 Aug 17. doi: 10.2174/0929867324666170817152554.

**Финансирование:** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-75-10211.

UDC 57.088.1, BBC 28.074

## DEVELOPMENT OF A NEW METHOD OF NONINVASIVE DIAGNOSTICS OF EARLY STAGES OF NEUROBLASTOMA BASED ON DETERMINATION OF THE LEVEL OF TUMOR-ASSOCIATED GANGLIOSIDE GD2

I. Doronin <sup>1</sup>, I. Kholodenko <sup>1</sup>, T. Shamanskaya <sup>2</sup>, S. Deev <sup>1</sup>, R. Kholodenko <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences; "Real Target" LLC, Russian Federation, 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya, 16/10

<sup>2</sup> Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Russian Federation, 117997, Moscow, Samoy Mashela str, 1

New method for the detection of tumor-associated GD2 ganglioside in the blood serum of cancer patients for diagnostics of early stages of GD2-positive tumors, in particular neuroblastoma, using the method of enzyme immunoassay is proposed. The primary localization of ganglioside GD2 in complexes with low density lipoproteins is shown, as well as sufficient sensitivity of the enzyme immunoassay for qualitative and quantitative determination of GD2 level, which makes possible to develop test systems for early diagnostics of GD2-positive oncological diseases.

**Key words:** Gangliosides, GD2, ELISA, early diagnostics of neuroblastoma.

Active development of tumor-associated markers is being conducted all over the world, the determination of its levels will allow to correctly diagnose cancer and choose the optimal treatment options. In recent years, it has been shown that not only proteins but also glycosphingolipids, in particular ganglioside GD2, which is overexpressed on many types of cancer, constituting about 10% of the total number of oncological diseases, including neuroblastoma, soft tissue sarcomas, osteosarcoma, small cell lung cancer, gliomas, retinoblastoma, melanoma, some lymphomas, and a number of other tumors could be such marker. The phenomenon of "shedding" of specific



onco-associated gangliosides into the blood, where they circulate in complexes with proteins [1], potentially allows to quantify the level of ganglioside and develop correlations with the stage of development of GD2-positive cancer, and, accordingly, to choose the optimal therapy approach. However, despite rapid development of immunotherapy methods for GD2-positive oncological diseases [2], there are currently no available methods for diagnosing of this oncomarker in clinical practice. It should be noted that the active shedding of GD2 begins on the early stages of tumor development, which makes it a convenient diagnostic marker for early screening of GD2-positive oncological diseases. Currently, for the qualitative and quantitative determination of the level of gangliosides, methods of mass spectrometry, thin-layer chromatography or high-performance liquid chromatography can be used, but it is difficult to perform such tests in a diagnostic laboratory that is not equipped with a special devices and reagents.

In the course of the work, various methods for isolating of blood lipoprotein fractions associated with GD2 ganglioside were studied, optimal sorption methods were selected for different types of plastic, also criteria for selecting the optimal method for determining the target antigen, characterized by minimal losses of GD2 ganglioside during the analysis, were formulated. It was shown that in the blood serum ganglioside GD2 is predominantly associated with low density lipoproteins and such complexation can be used both for concentrating ganglioside GD2 so for using in ELISA.

Developed method allows to obtain the level of circulating ganglioside GD2, that was shown both on the model human serum with exogenously added ganglioside GD2 and on the serum of patients with neuroblastoma that overexpress ganglioside GD2. Thus, the developed technology after clinical validation will allow to develop various test systems allowing to reliably determine the level of ganglioside GD2 and to choose an optimal scheme of treatment of oncological diseases, which are difficult to be cured by classical methods of therapy.

References: 1. Valentino L., Moss T., Olson E., Wang H.J., Elashoff R., Ladisch S. Shed tumor gangliosides and progression of human neuroblastoma. // *Blood*, 1990. v. 75(7): p. 1564-1567. 2. Kholodenko R.V., Kalinovsky D.V., Doronin I.I., Ponomarev E.D., Kholodenko I.V. Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations. // *Curr Med Chem*. 2017 Aug 17. doi: 10.2174/0929867324666170817152554.

**Grant:** Supported by RSF grant № 17-75-10211.

УДК 615.281

## РАЗРАБОТКА НОВЫХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ СТИМУЛЯТОРОВ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

**Даниленко Е.Д., Лебедев Л.Р., Левагина Г.М., Гамалей С.Г., Шишкина Л.Н., Усова С.В.**

*Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Кольцово Новосибирской области, Россия  
633010, г. Бердск Новосибирской области, ул. Химзаводская, 9  
danilenko\_ed@vector.nsc.ru*

Разработаны технологии получения новых лекарственных форм индукторов интерферона двуспиральных РНК на растворимых полимерных носителях, в составе полисахаридных капсул и гелей. Показано, что использованные технологические приемы позволяют повысить стабильность дсРНК, усилить их способность к индукции синтеза цитокинов и противовирусные свойства.

**Ключевые слова:** двуспиральные РНК; полимерные носители; полисахаридные микрокапсулы; вирус гриппа

Несмотря на значительные успехи в области разработки лекарственных средств, грипп и острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) по-прежнему являются слабо контролируемыми заболеваниями вследствие высокой гетерогенности и изменчивости вирусов. Поэтому использование в лечебной практике средств, повышающих неспецифическую резистентность (интерфероны, их индукторы), не теряет своей актуальности.

Созданный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» препарат Ридостин, содержащий в качестве активного начала двуспиральные РНК (дсРНК) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, успешно используется в терапии различных форм вирусных заболеваний, в том числе, гриппа. В настоящее время получены новые формы дсРНК на растворимых полимерных носителях – Ридостин Форте и Ридостин Про. В экспериментальных условиях показано, что введение этих препаратов позволяет усилить индукцию интерферона, удлинить его циркуляцию в крови и период ингибирования размножения вируса гриппа в легких мышей. Включение Ридостина Про в схему лечения больных гриппом и ОРВИ способствует сокращению продолжительности

заболевания (в среднем, на 2,7 дня) и интенсивности его клинических проявлений.

Для решения проблемы стабильности дсРНК разработан метод ее включения в состав полисахаридных капсул. Показано, что инкапсулирование обеспечивает повышение ферментативной устойчивости дсРНК. При интраназальном введении в составе конструкции препарат обладал способностью повышать выживаемость мышей, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и среднюю продолжительность их жизни (на 2,4 дня).

С целью усиления противовирусного эффекта дсРНК разработана ее новая лекарственная форма в виде геля для интраназального применения. Показано, что однократное введение препарата вызывало усиление синтеза цитокинов (ИФН- $\alpha$ , ФНО- $\alpha$ ) в легких и повышение метаболической активности альвеолярных макрофагов мышей. Препарат при лечебно-профилактической схеме применения повышал выживаемость мышей, инфицированных вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (коэффициент защиты- 41,7%), и среднюю продолжительность их жизни (на 3,6 сут).

Полученные данные подтверждают обоснованность использования данных методических подходов для создания новых лекарственных средств профилактики и лечения гриппа на основе дсРНК с улучшенными свойствами.

UDK 615.281

## DEVELOPMENT OF NEW THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC MEDICINAL DRUGS BASED ON STIMULANTS OF NON-SPECIFIC RESISTANCE

Danilenko E.D., Lebedev L.R., Levagina G.M., Gamaley S.G., Shishkina L.N., Usova S.V.

*Federal Budgetary Research Institution "State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Federal Service for Surveillance on Consumer*

*Rights Protection and Human Well-being, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia  
633010, r. Berdsk, Novosibirsk Region, Khimzavodskaya str., 9  
danilenko\_ed@vector.nsc.ru*

Technologies of obtaining of new pharmaceutical forms of interferon inducers, double-stranded RNA, based on soluble polymer carriers as well as part of polysaccharide capsules or gels were developed. It was shown that used technological approaches allow to increase dsRNA stability, enhance their ability to induce cytokine synthesis and antiviral properties.

**Key words:** double-stranded RNA; polymer carriers; polysaccharide microcapsules; influenza virus

Despite significant advances in the development of medicinal drugs, influenza and acute respiratory viral infections (ARVI) continue to be poorly controlled diseases due to the high degree of heterogeneity and variability of viruses. Therefore, the use of drugs that improve non-specific resistance (interferons and their inducers) does not lose its relevance.

The preparation Ridostin, developed at the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", containing double-stranded RNA (dsRNA) of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as active substance, is successfully used for the therapy of various forms of viral diseases, including influenza. At present, new forms of dsRNA on soluble polymer carriers - Ridostin Forte and Ridostin Pro were obtained. As was shown in experimental conditions the use of these drugs can enhance the induction of interferon, extend its circulation in the blood and the period of inhibition of the reproduction of the influenza virus in the lungs of mice. Inclusion of Ridostin Pro in the treatment regimen for patients with influenza and ARVI helps reduce the duration of the disease (on the average, by 2.7 days) and the intensity of its clinical manifestations.

To solve the problem of dsRNA stability a method for its inclusion in polysaccharide capsules has been developed. It was shown that encapsulation provides an increase in the enzymatic stability of dsRNA. Intranasally administered, the dsRNA within a construct composition had the ability to increase the survival rate of mice infected with the influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) and their average life-span (by 2.4 days).

In order to enhance the antiviral effect of dsRNA, its new pharmaceutical form of a gel for intranasal use has been developed. It was shown that a single drug administration exerted an increase in the synthesis of cytokines (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) in the lungs and an increase in the metabolic activity of alveolar macrophages of mice. The drug used in the treatment-prophylactic regimen increased the survival rate of mice, infected by influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) (protection factor-41.7%) and their average life-span (by 3.6 days).

The obtained data confirm the validity of using these methodological approaches to create new drugs for the prevention and treatment of influenza on the basis of dsRNA with improved properties.

УДК 577.112.083

## РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГМ-КСФ ЧЕЛОВЕКА

Есина Т.И., Волосникова Е.А., Гогина Я.С., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д., Гилева И.П.

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия.

633004, Новосибирская область, Бердск, ул. Химзаводская, д. 9

Тел.: +7 (383) 363-80-14

Моб.: +7 (952) 913-87-25

e-mail: esina\_ti@vector.nsc.ru

Разработана схема получения рекомбинантного гранулоцитарно- макрофагального колониестимулирующего фактора человека, позволяющая получать целевой белок с чистотой 96,2 %.

**Ключевые слова:** гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, полипептид, хроматография.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) – белок-цитокин, стимулирующий рост и дифференцировку гематopoэтических клеток (гранулоциты, макрофаги). ГМ-КСФ может быть использован в терапии различных патологических состояний иммунной и кроветворной систем (анемических и миелодиспластических синдромов, нейтропении, СПИДа и др.), последствий лучевой и химиотерапии опухолевых заболеваний [1].

Рекомбинантный белок ГМ-КСФ выделяли из биомассы рекомбинантного штамма E.coli SG20050/r280GM, полученной методом глубинного культивирования в лабораторном ферментере в стандартной среде LB-бульон. В процессе культивирования для индукции триптофанового промотора синтетического гена ГМ-КСФ при достижении оптической плотности культуральной жидкости  $A_{550} = (1,25 \pm 0,25)$  о.е. в среду вносили аналог триптофана – индолилуксусную кислоту до конечной концентрации 30-50 мкг/мл.

По результатам электрофореза биомассы с последующей денситометрией содержание целевого белка составляло не менее 15-20 % от суммарных клеточных белков.

Целевой белок синтезировался в клетках в виде нерастворимых телец включения. Для более полного извлечения белка ГМ-КСФ из отмывых телец включения при наименьшем их «загрязнении» экспериментально определены: значение pH 8,0 – 8,1 и концентрация мочевины в растворе 6 моль/л.

Для очистки белка ГМ-КСФ применялась комбинация двух анионообменных хроматографий на сорбентах с функциональными группами диэтиламиноэтила и четвертичного аммония при значении pH 8,0.

В ходе работы был получен препарат ГМ-КСФ с чистотой 96,2 % и выходом целевого белка более 60 % от исходного содержания, что составляет около 2-5 мг из 1 г влажных клеток.

Таким образом, разработана технология выделения белка ГМ-КСФ из биомассы клеток, позволяющая получать препараты полипептида, отвечающие требованиям, предъявляемым к рекомбинантным белкам для их использования в качестве лекарственных препаратов.

Литература:

1. Barouch D. H. et al. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF // *The Journal of Immunology*. 2002. Vol. 168. N 2. P. 562-568.

УДК 577.112.083

## ELABORATION OF THE METHOD FOR THE PURIFICATION OF RECOMBINANT HUMAN GM-CSF

Esina T.I., Volosnikova E.A., Gogina Y.S., Lebedev L.R., Danilenko E.D., Gileva I.P.

Institute of Medical Biotechnology SRC VB "Vector" Rosпотребнадзор,

Berdsk, Novosibirsk Region, Russia

A scheme for obtaining a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has been elaborated which allows for obtaining a target protein with a purity of 96.2%.

**Key words:** granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, polypeptide, chromatography.

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a protein-cytokine that stimulates the growth and differentiation of hematopoietic cells (granulocytes, macrophages). Therefore, GM-CSF can be used in the therapy of various pathological conditions of the immune and hematopoietic systems (anemic and myelodysplastic syndromes, neutropenia, AIDS, etc.), the sequelae of radiation and chemotherapy of tumor diseases [1].

The recombinant protein, GM-CSF, was isolated from the biomass of a recombinant *E. coli* strain SG20050 / p280GM obtained by submerged cultivation in a laboratory fermenter in a standard LB broth medium. During the process of cultivation, for the induction of the tryptophan promoter of the synthetic GM-CSF gene, when the optical density of the culture liquid reached  $A_{550} = (1,25 \pm 0,25)$  OU, an analogue of tryptophan - indolylacetic acid at a final concentration of 30-50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  was added to the medium. By the obtained results of electrophoresis of the biomass with subsequent densitometry, the amount of the target protein was no less than 15-20% of the total cellular proteins.

The target protein was synthesized in cells in the form of insoluble inclusion bodies. To more fully extract the protein GM-CSF from the washed inclusion bodies with the lowest "contamination", the pH value of 8.0-8.1 and the urea concentration in the solution of 6 mol / l were experimentally determined.

For the purification of GM-CSF, anion exchange chromatography was implemented twice: on sorbents with the functional groups of diethylaminoethyl and quaternary ammonium, at pH value of 8.0.

In the course of this work, a preparation of GM-CSF with a purity of 96.2% was obtained with a target protein yield of more than 60% of the initial content, which is about 2-5 mg from 1 g of wet cells.

Thus, a technology for extracting GM-CSF from the cell biomass has been developed which makes it possible to obtain polypeptide preparations that meet the requirements for recombinant proteins to be applied as medicinal drugs.

#### References:

1. Barouch D. H. et al. Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF // *The Journal of Immunology*. 2002. Vol. 168. N 2. P. 562-568.

УДК 577.15; 53.086

## РЕГУЛЯТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ТУР-ФРАГМЕНТА Ni(Fe)-ARD ДИОКСИГЕНАЗ В ЦИКЛЕ СИНТЕЗА МЕТИОНИНА И СО В МЕХАНИЗМЕ НОРМАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА

Матиенко Л.И., Бинюков В.И., Миль Е.М., Мосолова Л.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия  
119334 Москва ул. Косыгина 4  
e-mail: mila.matienko@yandex.ru

Обсуждается роль Ni(Fe)-наноструктур и Тур-фрагмента в механизме функционирования Ni(Fe)ARD Диоксигеназ в цикле синтеза метионина и СО. Метод АСМ был использован для исследования возможности формирования супрамолекулярных структур на основе Ni(Fe)ARD модельных систем за счет межмолекулярных Н-связей.

**Ключевые слова:** Ni(Fe)ARD Диоксигеназы, СО, метионин, модели ARD:  $\{M(\text{acac})_n + L^{2+} + \text{Tyr}\}$  ( $M = \text{Ni}^{\text{II}}, \text{Fe}^{\text{III}}, L^{2+} = \text{NMP}$  (NMP = N-метил-2-пирролидон), His = L-Гистидин); Тур = L-Тирозин,  $n=2,3$ ), наноструктуры,  $O_2$ , АСМ.

Ациредуктон Диоксигеназы Ni(Fe)ARD являются ферментами, участвующими в пути рециркуляции метионина (цикл MSP), который регулирует аспекты клеточного цикла [1]. Метилтиоаденозин (МТА), первый промежуточный продукт в цикле MSP, формируется из S-аденозил метионина (SAM) в процессе синтеза полиаминов у животных и этилена в растениях [1]. Ингибирование синтеза полиаминов, которые необходимы для роста и пролиферации клеток, тормозит репликацию ДНК. А увеличение концентрации полиаминов может привести к развитию злокачественных новообразований [1]. Концентрация МТА в клетках жестко контролируется циклом MSP, и Ni(Fe)ARD выполняют важнейшие функции в этом процессе. FeARD катализирует предпоследний шаг в метаболическом пути окисления ( $O_2$ ) Ациредуктона в формиат и кето-кислотный предшественник метионина 2-кето-4-(тиометил) бутират (КМТВ). Путь окисления ( $O_2$ ) Ациредуктона, катализируемый NiARD, не приводит к образованию метионина. Но в результате этой реакции

образуется нейротрансмиттер CO, идентифицированный в качестве анти-(про)апоптотической молекулы у млекопитающих [1].

Можно было предположить направляющую роль водородных связей, как один из важных факторов в регулировании синтеза метионина при участии Ni(Fe)ARD. Используя метод АСМ, мы впервые показали возможность самоорганизации комплексов никеля и железа, являющихся структурными и функциональными моделями Ni(Fe)ARD, в макроструктуры за счёт межмолекулярных Н-связей [2]. Ранее мы предположили регуляторную функцию Тир-фрагмента в механизме функционирования NiARD, приводящего к образованию CO. Мы впервые наблюдали самоорганизацию модельных тройных комплексов  $\{Ni(acac)_2 NMP Tyr\}$ ,  $\{Ni(acac)_2 His Tyr\}$  в стабильные супрамолекулярные структуры за счёт межмолекулярных Н-связей (АСМ). Эти факты свидетельствовали в пользу регуляторной роли Тир-фрагмента, приводящего к снижению активности NiARD фермента. Здесь мы впервые демонстрируем самоорганизацию за счёт Н-связей комплексов  $FeIII(acac)_3(His)_m(Tyr)_n(H_2O)_p$  (Tyr=L-Tyrosine, His=L-Histidine), моделирующих активный центр FeARD, в супрамолекулярные структуры, напоминающие по форме трубочку тубулина (АСМ). Формирование структур, подобных белку тубулина, может благоприятствовать активации  $O_2$  (при участии Тир-фрагмента) и последующим реакциям, ведущим к образованию метионина в случае катализа FeARD. Полученные данные могут приблизить нас к пониманию процессов, происходящих в результате функционирования Ni(Fe)ARD, роли Тир-фрагмента в синтезе метионина и CO в механизме нормального гомеостаза.

#### Литература:

1. Aditi R. Deshpande, Thomas C. Pochapsky, and Dagmar Ringe. *The Metal Drives the Chemistry: Dual Functions of Acireductone Dioxygenase* Chem. Rev. 2017. Vol. 117. № 15. P. 10474-10501.
2. Matienko Ludmila I., Binyukov Vladimir I., Mosolova Larisa A., Mil Elena M., Zaikov Gennady E. *Some Supramolecular Nanostructures based on Catalytic Active Nickel and Iron Heteroligand Complexes. Functional Models of Fe(Ni) Dioxygenases*. Chem. & Chem. Tech. 2014. Vol. 8. № 3. P. 339-348.

UDC 577.15; 53.086

## REGULATORY FUNCTION OF THE TYR-FRAGMENT OF NI(Fe)-ARD DIOXYGENASES ACTION IN THE CYCLE OF METHIONINE AND CO SYNTHESIS IN THE MECHANISM OF NORMAL HOMEOSTASIS

Matienko L.I., Binyukov V.I., Mil E.M., Mosolova L.A.

*The Federal State Budget Institution of Science, N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
 119334, Kosygin 4, Moscow  
 e-mail: mila.matienko@yandex.ru*

Role of Ni(Fe)-macrostructures and Tyr-fragment in mechanisms of Ni(Fe)ARD action, in synthesis of methionine and CO, is discussed. The AFM method was used to research the possibility of the formation of supramolecular structures based on Ni(Fe)ARD model systems due to H-bonds.

**Key words:** Ni(Fe)ARD Dioxygenases, CO, methionine, models of ARD:  $\{M(acac)_n+L^2+Tyr\}$  ( $M=Ni^{II}, Fe^{III}$ ,  $L^2 = NMP$  (NMP = N-methyl-2-pirollidone), His = L-Histidine); Tyr = L-Tyrosine, n=2,3), nanostructures,  $O_2$ , АСМ.

Acireductone Dioxygenases Ni(Fe)ARD participate in the methionine salvage pathway (MSP), that regulates the aspects of the cell cycle [1]. Methylthioadenosine (MTA) is the first intermediate in this pathway and is formed from S-adenosyl methionine (SAM) during polyamine synthesis in animals and ethylene synthesis in plants. Inhibition of polyamine synthesis, that are required for cell growth and proliferation, arrests DNA replication, and elevated polyamine is associated with tumor formation. The concentration of MTA in cells is tightly regulated with MSP, and Ni(Fe)ARD perform important functions in this process. FeARD catalyze the penultimate step in the pathway, the oxidative ( $O_2$ ) decomposition of Acireductone to formate and 2-keto-4-(thiomethyl)butyrate (KMTB), the keto-acid precursor of methionine. The Acireductone oxidation ( $O_2$ ), catalyzed with NiARD, does not lead to methionine formation. However, neurotransmitter CO, formed because of this reaction, has been identified as an anti-(pro) apoptotic molecule in mammals [1].

It was possible to assume a guiding role of hydrogen bonds, as one of the important factors in the regulation of methionine synthesis with Ni(Fe)ARD action. The first time we have successfully used the method of atomic force microscopy (AFM) to study the possibility of formation due to the intermolecular hydrogen bonds of supramolecular nanostructures, based on heteroligand nickel and iron complexes, that are structure and function model of Ni(Fe)

ARD [2]. We assumed previously possible regulatory function Tyr-fragment in the mechanism of functioning of the NiARD, resulting in the formation of CO. We observed for the first time the self-organization of model triple complexes  $\{Ni(acac)_2 NMP Tyr\}$ ,  $\{Ni(acac)_2 His Tyr\}$  into stable supramolecular structure due to intermolecular H-bonds (AFM). These data testified in favor of regulatory role of Tyr-fragment leading to reduce the NiARD activity. Here, we first demonstrate self-organization due to the H-bonds of complexes  $FeIIIx(acac)y(His)m(Tyr)n(H_2O)p$  (Tyr=L-Tyrosine, His=L-Histidine), the modeling Fe-ARD active center, to supramolecular structures resembling a tube of tubulin. Formation of structures similar to the protein tubulin, may favor the activation of O<sub>2</sub> (with the participation of Tyr-fragment) and the subsequent reactions leading to the formation of methionine. The data obtained can bring us closer to an understanding of the processes occurring as a result of operation of Ni(Fe)ARD, Tyr-fragment role in the synthesis of methionine and CO in the mechanism of normal homeostasis.

#### References:

1. Aditi R. Deshpande, Thomas C. Pochapsky, and Dagmar Ringe *The Metal Drives the Chemistry: Dual Functions of Acireductone Dioxygenase* Chem. Rev. 2017, 117, N15, P.10474-10501.
2. Matienko Ludmila I., Binyukov Vladimir I., Mosolova Larisa A., Mil Elena M., Zaikov Gennady E. *Some Supramolecular Nanostructures based on Catalytic Active Nickel and Iron Heteroligand Complexes. Functional Models of Fe(Ni) Dioxygenases*, Chem. & Chem. Tech., 2014, V.8, N 3, P. 339-348.

УДК 57.085.23

## СОЗДАНИЕ БАНКА ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР РАКОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ФАРМСКРИНИНГА И ПЕРСНИФИЦИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ

Г.К.Рысцов<sup>1</sup>, А.Н. Шибяев<sup>2</sup>, Ю.В. Павлова<sup>2</sup>, К.С. Сорокин<sup>3</sup>, В.Б. Кешелова<sup>3</sup>, Д.С. Михайленко<sup>4,5</sup>,  
Н.Г. Кешишев<sup>5</sup>, М.Ю. Земскова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН). 142290 Московская область, г.Пушино, пр-т Науки, д.5, Тел./факс: (495)956-33-70; boronin@ibpm.pushchino.ru; rta@ibpm.pushchino.ru; www.ibpm.ru

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского» (ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского). 129110, г. Москва, ул. Щепкина 61/2, корпус 1, «Административный» подъезд. Тел./факс (499) 674-07-09; moniki@monikiweb.ru

<sup>3</sup> ООО "ПРОСТАГНОСТ" 143026, МОСКВА Г, СКОЛКОВО ИННОВАЦИОННОГО ЦЕНТРА ТЕР, НОБЕЛЯ УЛ, ДОМ 7, ПОМЕЩЕНИЕ ЧАСТЬ ПОМ 14 ЭТАЖ 4; Тел./факс: 8 (926) 973-09-63

<sup>4</sup> НИИ молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр. 2. Тел./факс:(499) 248-05-53; rektorat@sechenov.ru, expedition@mma.ru

<sup>5</sup> НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина - филиал ФГБУ "НМИЦ радиологии" Минздрава России. 105425, Москва, ул. Парковая 3-я, 51, стр.1, Тел./факс: (499) 110-40-67

Целью данной работы было (1) определение основных подходов для создания биобанков клеточных культур и модельных систем для реконструирования микросреды опухоли. (2) Анализ клеточных факторов, которые в дальнейшем могут служить биомаркерами эффективности воздействия противораковых препаратов.

**Ключевые слова:** Рак, строма, коллекция клеток, клеточные линии, онкология, фарм-скрининг, первичная культура.

Длительное время перевиваемые опухолевые клетки, растущие в монокультуре, являлись общепринятой моделью для тестирования лекарственных (в частности, противораковых) препаратов. Однако, в последние десятилетия, накопленные статистические данные о соответствии доклинического тестирования и применения в клинике разработанных препаратов, выявили низкую эффективность их действия для пациентов, опухолевые образования которых часто демонстрировали устойчивость к широко применяемым препаратам.

Данное явление может возникать по причине того, что монокультуры клеток являются крайне приближенными моделями злокачественных новообразований. Правильнее описывать опухоли как "органы", состоящие из нескольких видов тканей, в основном, комбинации эпителиальных и стромальных клеток. Связь между эпителием и стромой осуществляется через физические взаимодействия между эпителиальными и стромальными клетками, через физические взаимодействия этих клеток с внеклеточным матриксом и, также через экспрессию сигнальных молекул, которые передаются между эпителием и стромой в процессе, известном как эпителиально-стромальные взаимодействия. Главное, что некоторые комбинации сигналов

стромы могут приводить чувствительные опухолевые клеточные линии в устойчивое к используемым препаратам состояние.

Одним из решений данной проблемы является использование тест-систем, включающих в себя несколько типов клеток и имитирующих микросреду опухоли. Подобные клеточные модели способны более точно воспроизводить условия, существующие внутри реальной опухоли за счет межклеточных взаимодействий. Использование подобных тест-систем позволяет отсеять часть неэффективных препаратов еще на стадии, предшествующей тестированию на лабораторных животных и в клинических испытаниях, что значительно ускоряет и удешевляет разработку новых препаратов. Однако на данный момент в РФ отсутствуют поставщики как первичных, так и перевиваемых клеток, необходимых для создания высокопроизводительных клеточных моделей для скрининга лекарственных средств.

Разработаны протоколы/последовательность протоколов/действий/операций создания биобанков клеточных культур с целью дальнейшего моделирования микросреды опухолей. Эти протоколы/действия/операции включают: -Выделение клеток рак-ассоциированной стромы и эпителия опухолей из хирургического материала и материалов биопсий

Размножение первичных клеточных культур,- Криоконсервацию клеточных культур, - Маркировку клеточных культур флуоресцентными маркерами с целью дальнейшего определения различных типов клеток, растущих в смешанных (гетерогенных) культурах, - Характеристику двух- и трехмерных моделей гетерогенных клеточных культур,- Тестирование лекарственных препаратов с использованием двумерных и трёхмерных гетерогенных культур клеток,- Оценку физиологического состояния различных клеток в гетерологичных культурах методами анализа клеточной пролиферации, клеточной гибели, транс-дифференцировки и изменений в количестве раковых стволовых клеток.

Проведена характеристика первичных клеток стромы, выделенных из хирургического материала опухоли предстательной железы и мочевого пузыря. Установлено, что:

- культуры фибробластов стромы, ассоциированных с раком, содержат миофибробласты, что указывает на способность этих клеток к транс-дифференцировке в процессе развития опухоли,- анализ белков методом вестерн-блоттинга и иммуноцитохимии позволил выявить клеточные маркеры, уровень экспрессии которых меняется при переходе клеток к миофибробластному фенотипу. Соответствующие ему клеточные характеристики могут являться потенциальными биомаркерами «рак-ассоциированной» стромы

- показано изменение уровня экспрессии одного из исследованных биомаркеров (ITGAV) в моче больных раком предстательной железы по отношению к контрольной группе. Обсуждается возможность применения первичных клеточных культур стромы как для реконструирования микросреды опухоли, с целью изучения и моделирования межклеточных взаимодействий, так и для использования в области «персонализированной медицины», с целью определения индивидуальной чувствительности пациентов к анти-раковым лекарственным препаратам и их комбинациям.

Разработаны подходы к созданию биобанков клеточных культур для задач тестирования эффективности потенциальных лекарственных препаратов и их комбинаций. Разработана методика выделения и наращивания клеточных культур рака предстательной железы и мочевого пузыря. Определены параметры трансдифференцированных клеток стромы ассоциированных с опухолями предстательной железы. Выявлены потенциальные биомаркеры изменения фибробластов стромы в процессе развития рака. Показана возможность использования клеточного белка ITGAV для диагностики рака предстательной железы.

#### Литература:

1. *The contribution of mechanistic understanding to phenotypic screening for first-in-class medicines.* J Biomol Screen. 2013 Dec;18(10):1186-92. doi: 10.1177/1087057113501199. Epub 2013 Aug 27
2. *Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism.* Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Dev Cell. 2010 Jun 15;18(6):884-901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012.
3. *Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion.* Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Ogino S, Wargo JA, Golub TR. Nature. 2012 Jul 26;487(7408):500-4. doi: 10.1038/nature11183.
4. *Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors.* Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherland DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. Nature. 2012 Jul 26;487(7408):505-9. doi: 10.1038/nature11249.
5. *Personalized Preclinical Trials in BRAF Inhibitor-Resistant Patient-Derived Xenograft Models Identify Second-Line Combination Therapies.* Krepler C, Xiao M, Sproesser K, Brafford PA, Shannan B, Beqiri M, Liu Q, Xu W, Garman B, Nathanson KL, Xu X, Karakousis GC, Mills GB, Lu Y, Ahmed TA, Poulidakos PI, Caponigro G, Boehm M, Peters M, Schuchter LM, Weeraratna AT, Herlyn M. Clin Cancer Res. 2016 Apr 1;22(7):1592-602. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1762. Epub 2015 Dec 16.

UDC 57.085.23

## CREATION OF A BANK OF PRIMARY CULTURES OF HUMAN CANCER CELLS FOR PHARMACEUTICAL SCREENING AND PERSONIFIED MEDICINE

G.K.Rystsov <sup>1</sup>, A.N. Shibaev <sup>2</sup>, Y.V. Pavlova <sup>2</sup>, K.S. Sorokin <sup>3</sup>, V.B. Keshelava <sup>3</sup>, D.S. Mihailenko <sup>4,5</sup>, N.G. Keshishev <sup>5</sup>, M.Y.Zemskova <sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences (IBPM RAS). 142290 Moscow Region, Pushchino, Nauki Ave., 5, Phone / fax: (495) 956-33-70; boronin@ibpm.pushchino.ru

<sup>2</sup> State budgetary healthcare institution of the Moscow region "Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute. MF Vladimirsky ». 129110, Moscow, st. Shchepkina 61/2, building 1, "Administrative" entrance.

<sup>3</sup> Ltd. "PROSTAGNOST" 143026, MOSCOW, SKOLKOVO INNOVATION CENTER TER, st. NOBEL, HOUSE 7

<sup>4</sup> Research Institute of Molecular Medicine FGAOU VO First MG MU them. THEM. Sechenov of the Ministry of Health of Russia; 119991, Moscow, Трубецкая, д.8, стр. 2.

<sup>5</sup> Research Institute of Urology and Interventional Radiology - a branch of FGBU "NMIC of radiology" of the Ministry of Health of Russia. 105425, Moscow, st. Parkovaya 3, 51, p.1,

The aim of this work was (1) to determine the main approaches for creating biobanks of cell cultures and model systems for reconstructing the tumor microenvironment. (2) Analysis of cellular factors that can later serve as biomarkers for the effectiveness of anticancer drugs.

**Key words:** Cancer, stroma, collection of cells, cell lines, oncology, pharm-screening, primary culture.

For a long time, transplantable tumor cells growing in monoculture were a common model for testing drugs (in particular, anticancer drugs). However, in recent decades, the accumulated statistical data on the compliance of preclinical testing and the use of developed drugs in the clinic have revealed a low effectiveness of their action for patients whose tumor formations often showed resistance to widely used drugs.

This phenomenon can arise because monocultures of cells are very approximate models of malignant neoplasms. It is more accurate to describe tumors as "organs", consisting of several types of tissues, mainly combinations of epithelial and stromal cells. The connection between the epithelium and the stroma is accomplished through physical interactions between epithelial and stromal cells, through the physical interactions of these cells with the extracellular matrix and also through the expression of signaling molecules that are transferred between the epithelium and the stroma in a process known as epithelial stromal interactions. The main thing is that some combinations of stromal signals can lead sensitive tumor cell lines into a drug-resistant state.

One solution to this problem is the use of test systems, which include several types of cells and imitate the microenvironment of the tumor. Such cellular models are able to more accurately reproduce the conditions existing inside a real tumor due to intercellular interactions. The use of such test systems allows us to weed out some of the ineffective drugs even at the stage preceding testing on laboratory animals and in clinical trials, which significantly speeds up and cheapens the development of new drugs. However, at the moment, there are no suppliers in Russia either of primary or transplantable cells needed to create high-performance cellular models for drug screening.

Protocols / sequence of protocols / actions / operations for creating biobanks of cell cultures have been developed with the aim of further modeling the microenvironment of tumors. These protocols / activities / operations include:

Assignment of cells of cancer-associated stroma and epithelium of tumors from surgical material and biopsy materials, -Institution of primary cell cultures, - Cryopreservation of cell cultures, - Marking of cell cultures with fluorescent markers to further define various types of cells growing in mixed (heterogeneous) cultures, - Characterization of two- and three-dimensional models of heterogeneous cell cultures, - Testing of drugs using two-dimensional and three-dimensional heterogeneous cell cultures, - Evaluation of the physiological state of various cells in heterologous cultures by methods of analysis of cell proliferation, cell death, trans-differentiation and changes in the number of cancer stem cells.

Characteristic of primary stromal cells isolated from the surgical material of tumors of the prostate and bladder. Determined that: - stromal fibroblast cultures associated with cancer contain myofibroblasts, which indicates the ability of these cells to trans-differentiate during tumor development, - analysis of proteins by Western blotting and immunocytochemistry made it possible to identify cell markers whose expression level changes when the cells pass to the myofibroblast phenotype. Corresponding cell characteristics may be potential biomarkers of the "cancer-associated" stroma, - shows the change in the expression level of one of the biomarkers (ITGAV) studied in the urine of patients with prostate cancer in relation to the control group.



The possibility of using primary stromal cell cultures for reconstructing the tumor microenvironment, for the purpose of studying and modeling of intercellular interactions, and for use in the field of "personalized medicine" is being discussed with the aim of determining the individual sensitivity of patients to anti-cancer drugs and their combinations.

The approaches to the creation of biobanks of cell cultures for the problems of testing the effectiveness of potential drugs and their combinations have been developed. A technique for isolating and enhancing cell cultures of prostate and bladder cancer has been developed. The parameters of transdifferentiated stromal cells associated with tumors of the prostate gland are determined. Potentials identified.

#### References:

1. The contribution of mechanistic understanding to phenotypic screening for first-in-class medicines. *J Biomol Screen*. 2013 Dec;18(10):1186-92. doi: 10.1177/1087057113501199. Epub 2013 Aug 27
2. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Dev Cell*. 2010 Jun 15;18(6):884-901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012.
3. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Ogino S, Wargo JA, Golub TR. Nature*. 2012 Jul 26;487(7408):500-4. doi: 10.1038/nature11183.
4. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. Nature*. 2012 Jul 26;487(7408):505-9. doi: 10.1038/nature11249.
5. Personalized Preclinical Trials in BRAF Inhibitor-Resistant Patient-Derived Xenograft Models Identify Second-Line Combination Therapies. *Krepler C, Xiao M, Sproesser K, Brafford PA, Shannan B, Beqiri M, Liu Q, Xu W, Garman B, Nathanson KL, Xu X, Karakousis GC, Mills GB, Lu Y, Ahmed TA, Poulikakos PI, Caponigro G, Boehm M, Peters M, Schuchter LM, Weeraratna AT, Herlyn M. Clin Cancer Res*. 2016 Apr 1;22(7):1592-602. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1762. Epub 2015 Dec 16.

УДК 612.017.1

## СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ НЕЙТРОФИЛЬНОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У МЫШЕЙ

**Никольский А.А., Шиловский И.П., Бабахин А.А., Гайсина А.Р., Камышников О.Ю., Хаитов М.Р.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия  
 115478, Москва, Каширское ш., дом 24  
 e-mail: aa.nikolskii@nrcii.ru

Была создана экспериментальная мышинная модель бронхиальной астмы (БА) с преимущественной инфильтрацией нейтрофилов в лёгкие. Созданная модель может быть использована для изучения эффективности новых лекарственных средств для терапии нейтрофильной БА.

**Ключевые слова:** нейтрофильная бронхиальная астма, мышинная модель.

Бронхиальная астма - это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей [4]. В 80% случаев БА имеет аллергическую природу и сопряжена с инфильтрацией в ткань легких провоспалительных клеток - эозинофилов [3]. В то же время при нейтрофильной БА происходит инфильтрация других провоспалительных клеток - нейтрофилов [1,2]. Пациенты с нейтрофильной БА резистентны к лечению кортикостероидами, поэтому актуальна задача создания и испытания новых лекарственных препаратов для её лечения. Целью данного исследования было создание модели нейтрофильной БА у мышей.

Исследования проводили на мышах-самках BALB/c весом 18-20 г, возрастом 6-8 недель. Для моделирования эозинофильной БА мышей иммунизировали 20 мкг аллергена овальбумина (OVA), эмульгированного в адьюванте Al(OH)<sub>3</sub> в дни 0, 14 и 28. Для моделирования нейтрофильной БА мышей аналогично иммунизировали OVA, но в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). Обоим группам мышей в дни 42-44 проводили интраназальные введения 10% OVA по 50 мкл. Группа 3 состояла из интактных животных. На 45 день измерялись уровни IgE, IgG1, IgG2a антител методом ИФА. Гиперреактивность бронхов (ГРБ) измерялась с помощью неинвазивной плетизмографии. На 46 день был собран бронхоальвеолярный лаваж

(БАЛ) для подсчета клеток методом световой микроскопии.

У иммунизированных мышей уровни IgE, IgG1, IgG2a значительно возросли по сравнению с интактной группой. ГРБ у этих животных была в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе. Изучение клеточного состава БАЛ показало, что иммунизации с ПАФ приводят к увеличению количества нейтрофилов в БАЛ в 1,3 раза, и снижению количества эозинофилов в 2,4 раза по сравнению с группой, иммунизированной с использованием Al(OH)<sub>3</sub>. В то же время в интактной группе указанные клетки не детектировались.

Предложенная схема иммунизации мышей с использованием ПАФ в смеси с модельным аллергеном позволяет индуцировать у мышей признаки нейтрофильной БА. Созданная модель может быть использована для тестирования новых противоастматических препаратов. Работа поддержана грантом РФФИ № 16-54-53089.

Литература:

1. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F. Th17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009. Vol. 123. N. 5. P. 1185–1187.
2. Cosmi L, Liotta F, Maggi E. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis // *Allergy*. 2011. Vol. 66. N. 8. P. 989–998.
3. Shilovsky I.P., Babakhin A.A., Shershakova N.N., Kamyshnikov O.Y., Sundukova M.S., Gaisina A.R., Laskin A.A., Buzuk A.M., Ivanova A.S., Khaitov M.R. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice // *Current Trends in Immunology*. 2015. Vol. 16. P. 79-91.
4. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches // *Nat Med*. 2012. Vol. 18. P. 716–725.

UDC 612.017.1

## DEVELOPMENT OF A MURINE MODEL OF NEUTROPHILIC BRONCHIAL ASTHMA

**Nikolskii A.A., Shilovskiy I.P., Babakhin A.A., Gaisina A.R., Kamyshnikov O.Y., Khaitov M.R.**

National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia  
115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24  
e-mail: aa.nikolskii@nrcki.ru

It was developed an experimental 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 drugs for the therapy of neutrophilic asthma.

**Key words:** neutrophilic bronchial asthma, mouse model.

Bronchial asthma (BA) is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract [4]. Up to 80% cases BA has allergic ethology and associated with infiltration into the lung tissue of proinflammatory cells - eosinophils [3]. At the same time, neutrophilic BA is connected with the infiltration of other pro-inflammatory cells - neutrophils [1,2]. Patients with neutrophilic BA are resistant to treatment with corticosteroids. Therefore, the search for novel approaches to treat this pathology is the actual task of modern medicine. The purpose of this study was to develop mouse model of neutrophilic bronchial asthma.

The studies were performed using female mice BALB/c weighing 18-20 g, aged 6-8 weeks. In order to induce eosinophilic BA, mice were immunized with 20 µg of ovalbumin allergen (OVA) emulsified in Al(OH)<sub>3</sub> adjuvant on days 0, 14 and 28. In order to induce neutrophilic BA, mice were similarly immunized with OVA, but in a mixture with complete Freund's adjuvant (CFA). Both groups of mice on days 42-44 received 50 µl intranasal administration of 10% OVA solution. Group 3 consisted of intact animals. On day 45 the levels of IgE, IgG1, IgG2a antibodies were measured by ELISA. Bronchial hyperresponsiveness (BHR) was measured by non-invasive plethysmography. On day 46 bronchoalveolar lavage (BAL) was collected for counting cells by light microscopy.

Results. The levels IgE, IgG1, IgG2a were increased significantly in OVA immunized mice, compared to the intact group. BHR in these animals was 1,5 times higher than that in the control group. Analysis of BAL cell composition showed, that OVA immunizations with CFA led to increase in the number of neutrophils in 1,3 times and decrease in the number of eosinophils in 2,4 times, compared to the group immunized using Al(OH)<sub>3</sub>. At the same time, these cells were not detected in the intact mice.

The proposed scheme of immunization of mice with the use of CFA allows to induce important feature

neutrophilic BA. The developed model can be used for the testing of novel anti-asthmatic drugs. The study was supported by RFBR grant No 16-54-53089.

References:

1. Al-Ramli W., Prefontaine D., Chouiali F. Th17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009. Vol. 123. N. 5. P. 1185–1187.
2. Cosmi L., Liotta F., Maggi E. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis // *Allergy*. 2011. Vol. 66. N. 8. P. 989–998.
3. Shilovsky I.P., Babakhin A.A., Shershakova N.N., Kamyshnikov O.Y., Sundukova M.S., Gaisina A.R., Laskin A.A., Buzuk A.M., Ivanova A.S., Khaitov M.R. Adjuvant and adjuvant-free protocols produce similar phenotypes of allergic asthma in mice // *Current Trends in Immunology*. 2015. Vol. 16. P. 79–91.
4. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches // *Nat Med*. 2012. Vol. 18. P. 716–725.

УДК 616:612.017.1

## ЭТАПЫ СОЗДАНИЯ ЛЕЧЕБНОЙ ГРАНУЛИРОВАННОЙ ФОРМЫ КЛЕЩЕВОГО МИКСТ-АЛЛЕРГЕНА ДЛЯ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

**Берзец В.М., Хлгтян С.В., Петрова Н.С., Васильева А.В., Петрова С.Ю.**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова,  
 Москва, Россия  
 105064, Российская Федерация, Москва, М.Казенный пер., д.5а  
 E-mail: laball@yandex.ru

Получение и изучение свойств водно-солевого микст-экстракта из клещей домашней пыли *D.pteronysinus* и *D.farinae* для создания лечебной гранулированной формы, предназначенной для проведения аллергенспецифической иммунотерапии сублингвальным способом.

**Ключевые слова:** клещи домашней пыли, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, сублингвальная форма, аллергия

В настоящее время аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является наиболее обоснованным методом лечения IgE-зависимых аллергических заболеваний [1]. АСИТ приводит к снижению аллергочувствительности к вводимому аллергену и, в конечном итоге, вызывает уменьшение или полное исчезновение клинических симптомов при естественной экспозиции аллергена [2]. В широкой клинической практике в настоящее время используют подкожный (ПКИТ) и сублингвальный (СЛИТ) способы АСИТ [3,4]. Сублингвальная иммунотерапия отличается удобством применения, выраженным снижением системных и местных побочных эффектов, а также доказанной клинической эффективностью [1,5]. На международном фармакологическом рынке существует немало препаратов, предназначенных для сублингвального применения. В России, к сожалению, в настоящее время не производится сублингвальных препаратов клещевых аллергенов для проведения АСИТ [1, 6, 7].

Ранее нами была разработана технология получения сублингвальной гранулированной формы лечебного препарата аллергена из клещей *D.farinae* [8]. Показано, что полученный препарат не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов.

Целью нашего исследования является создание лечебного препарата микст-аллергена для специфической иммунотерапии сублингвальным способом.

Оно состоит из трех этапов:

- разработка технологии получения водно-солевого не содержащего фенола микст-экстракта из клещей *D.pteronysinus* и *D.farinae*
- изучение физико-химических и иммунобиологических свойств препарата
- создание лечебной гранулированной формы микст-аллергена из клещей *D.pteronysinus* и *D.farinae*, предназначенной для проведения аллергенспецифической иммунотерапии сублингвальным способом.

В данной работе изложены результаты первых двух этапов создания лечебной формы аллергена.

Согласно разработанной нами технологии получен водно-солевой микст-экстракт (ВСМЭ) из клещей

домашней пыли *D.pteronyssinus*(Der p) и *D.farinae*(Der f). Изучение физико-химических свойств ВСМЭ показало, что концентрация белка в препарате составила  $10000 \pm 2000$  PNU; длительность хранения 12 - 24 дней при  $t_0$  от -3 до -6 оС. ВСМЭ анализировали методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецил-сульфата натрия и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ). Электрофореграмма представляет собой многокомпонентную смесь белков и пептидов; в препарате имеются фракции белков с молекулярной массой приблизительно 26 кДа, что согласуется с данными литературы, и соответствует главным клещевым аллергенам Der p1/Der f1 [9]. Минорные фракции аллергенов не выявляются на фореграмме, что, вероятно, связано с их низкой концентрацией в анализируемом препарате. ОФ ВЭЖХ выявила наличие от двух до восьми белковых фракций в растворе (в зависимости от условий проведения эксперимента), а также присутствие множественных фрагментированных пептидных молекул.

Методом ИФА с кроличьими поликлональными сыворотками, полученными в результате сенсibilизации животных рекомбинантными аллергенами Der f1 и Der f2, показана положительная реакция ВСМЭ с IgG-антителами кроликов, сенсibilизированных рекомбинантными аллергенами Derp1 и Der f1, что свидетельствует о сохранении ВСМЭ иммуногенных свойств.

Проведено изучение хронической токсичности и безвредности клещевого микст-аллергена на белых лабораторных крысах и морских свинках. Животные получали экспериментальный препарат по разработанной схеме. В ходе проведения эксперимента внешних признаков нарастающей интоксикации ни в основной, ни в контрольной группе отмечено не было. По окончании эксперимента макроскопический осмотр внутренних органов животных признаков токсического поражения не выявил.

Исходя из наших результатов, можно сделать заключение, что полученный водно-солевой микст-экстракт из клещей *D.pteronyssinus* и *D.farinae* может быть основой для создания лечебной гранулированной сублингвальной формы аллергена. Данная форма лечебного препарата обладает доказанной клинической эффективностью и отличается удобством применения, что особенно важно в педиатрической практике.

#### Литература:

1. Астафьева Н.Г., Гамова И.В., Удовиченко Е.Н. и др. Место аллергенспецифической иммунотерапии в лечении атопии // *Consilium medicum*. – 2013. – № 3. – С. 55-61.
2. Хутеева С.Х., Федосеева В.Н. Аллергенспецифическая иммунотерапия бронхиальной астмы – М.: Экон, – 2000. – С.250
3. Сублингвальная иммунотерапия. Меморандум Всемирной организации по аллергии (WAO) // *Астма*. – 2010. – Т. 11, № 1. – С. 5-57.
4. Yuta A., Miyamoto Y., Ogihara H., Hattori R., Okubo K. Antigen specific sublingual immunotherapy for pediatric Japanese cedar pollinosis. *Arerug*, 2009, Vol. 58, no.2, pp.124-132.
5. Воробьева О.В., Гуцин И.С. Контролируемые исследования эффективности и безопасности аллерген-специфической иммунотерапии: исторический аспект // *Российский аллергологический журнал*. – 2011. – № 4. – С. 3-14.
6. Бжедугова, Е.Р., Ненашева Н.М. Эффективность и безопасность сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии аллергенами клещей домашней пыли // *Российский аллергологический журнал*. – 2008. – № 6. – С. 67–73.
7. Park K.H, Son M., Choi S.Y., Park H.J., Lee J.H., Jeong K.Y., Lee J.S., Park J.W. In vitro evaluation of allergen potencies of commercial house dust mite sublingual immunotherapy reagents. *Allergy Asthma Immunol Res.*, 2015 Vol. 7, no.2, pp.124-129.
8. Бержец В.М., Коренева Е.А., Петрова Н.С., и соавт. Способ получения гранулированной лекарственной формы из аллергена клещей рода *Dermatophagoides farinae* // Патент России №: 2216353.2002. С. 1.
9. Коровкина Е.С., Мокронослова М.А. Аллергия к клещам домашней пыли с позиции молекулярной аллергологии // *Медицинская иммунология*– 2012. – Т. 14, № 4-5. – С. 279-288.

UDC 616:612.017.1

## STUDY OF THE PROPERTIES OF THE MIXED HOUSE DUST MITE ALLERGEN WITH THE AIM OF CREATING A SUBLINGUAL FORM

Berzhets V. M., Khlgtatian S.V., Petrova N.S., Vasilyeva A.V., Petrova S.Yu.

**Key words:** home dust mite allergens, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, sublingual form, allergy.

Currently allergen specific immunotherapy (AIT) is the most pathogenetically justified method of the IgE-dependent allergic diseases treatment (1). AIT leads to a decrease of the allegrosensibility to the administered allergen

and, finally, it causes a reduction or complete disappearance of clinical symptoms upon natural allergen exposure (2). In wide clinical practice subcutaneous (SCIT) and sublingual (SLIT) AIT are currently used(3,4). Sublingual immunotherapy is distinguished by the convenience of use, a pronounced decrease in systemic and local side effects and proven clinical efficiency (1,5). There are many medications intended for sublingual use at the international pharmacological market. Unfortunately, home dust mites allergen sublingual form for AIT are not produced in Russia at the present time(1,6,7).

Previously in our laboratory there was developed the production technology of the sublingual allergen from *D. farinae* mites. We have shown that this species was not toxic and did not cause significant side effects (8).

The purpose of this study is to create mixed allergen from mites *D. pteronyssinus* and *D. farinae* for allergen-specific immunotherapy sublingually.

It consists of three stages:

- to develop a technology for obtaining mixed allergen water-salt extract (WSME) without phenol;
- to study the physico-chemical and immunobiological properties of the resulting mixed allergen;
- to create a therapeutic granular form of the mixed allergen from mites *D. pteronyssinus* and *D. farinae* for allergen-specific immunotherapy sublingually.

In this abstract we have shown the results of the first two stages.

According to our technology the WSME of the house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) and *Dermatophagoides farinae* (Der f) are obtained. The study of the physico-chemical properties of the received WSME have shown a protein content  $10000 \pm 2000$  PNU. The storage duration is 12 - 24 days at the temperature from -3 to -6 C. WSME was analyzed by electrophoresis in a polyacrylamide gel in the presence of dodecyl-sodium sulfate and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC). The electrophoregram revealed that this species had proteins with a molecular mass of approximately 26 kDa, which was consistent with the literature data and corresponded with major mite allergens Der p1/Der f1 (cysteine protease) (9). Minor allergens were not defined on electrophoregram, that was probably due to their low concentration in the analyzed species. RP HPLC revealed the presence from two to eight protein fractions in the solution (depending on the conditions of the experiment) and the presence of multiple fragmented peptide molecules.

ELISA was performed with polyclonal rabbit serum, obtained as a result of sensitization of animals with recombinant allergens der P1 and der F1. ELISA have shown positive reaction WSME with IgG-antibodies of rabbits sensitized with recombinant allergens Der p1 and Der f1, that indicated the preservation of immunogenic properties.

We studied the acute and chronic toxicity of the received mixed allergen on laboratory animals. The animals received the experimental species according to the developed scheme. During the experiment external signs of increasing intoxication were found neither in the main group nor in the control group. At the end of the experiment a macroscopic examination of the internal organs of the animals showed no signs of toxic damage.

Based on our results, we can conclude, that the resulting water-salt mixed allergen from mites *D. pteronyssinus* and *D. farinae* may be used as the basis for creating a therapeutic granular sublingual form of dust mite mixed allergen. This form of therapeutic species has proven clinical effectiveness and is characterized by the convenience of use. That is especially promising for application in pediatric practice.

#### References:

1. Astafieva N.G., Gamova I.V., Udovichenko E.N. and others. Place of the allergen-specific immunotherapy in the atopy's treatment. *Consilium medicum*, 2013, no. 3. pp. 55-61.
2. Khuteeva S.KH., Fedoseeva V.N. Allergen-specific immunotherapy of Asthma. *Ekon*, 2000, p. 250
3. Sublingual immunotherapy. Memorandum of the World Allergy Organization (WAO). *Asthma*, 2010, Vol. 11, no.1, pp. 5-57.
4. Yuta A., Miyamoto Y., Ogihara H., Hattori R., Okubo K. Antigen specific sublingual immunotherapy for pediatric Japanese cedar pollinosis. *Alerug*, 2009, Vol. 58, no. 2, pp. 124-132.
5. Vorobieva O.V., Gushhin I.S. Controlled trials of the efficiency and safety of allergen-specific immunotherapy: historical aspect. *Russian Allergology Journal*, 2011, no. 4, pp. 3-14.
6. Bzhedugova, E.R., Nenashva N.M. Efficiency and safety of house dust mite sublingual immunotherapy. *Russian Allergology Journal*, 2008, no.6, pp. 67-73.
7. Park K.H, Son M., Choi S.Y., Park H.J., Lee J.H., Jeong K.Y., Lee J.S., Park J.W. In vitro evaluation of allergen potencies of commercial house dust mite sublingual immunotherapy reagents. *Allergy Asthma Immunol Res.*, 2015 Vol.7, no. 2, pp. 124-129.
8. Berzhets V.M., Koreneva E.A., Petrova N.S. and co-authors. The way of reception of granular pharmaceutical forms of mite *Dermatophagoides farinae*'s allergen. Utility patent no. 2216353, 2002, p. 1.
9. Korovkina E.S., Mokronosova M.A. House dust mite allergy from the molecular allergology position. *Medical immunology*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 279-288.

## ДОСТИЖЕНИЯ В ОБЛАСТИ 3Д-БИОПРИНТИНГА И БИОФАБРИКАЦИИ

### ACHIEVEMENTS IN 3D BIOPRINTING AND BIOFABRICATION

1. АКТИВНОСТЬ ИЗОФОРМ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ И ОСТЕОАРТРИТЕ, А.В.Попов, Д.И.Козлова, П.А.Игнатъева, М.Ф.Баллюзек ..... 436	436
BUTYRYLCHOLINESTERASE ISOFORMS ACTIVITY IN RHEUMATOID AND OSTEOARTHRITIS, A.Popov, D.Kozlova, P.Ignatyeva, M.Balluzek ..... 437	437
2. ВЛИЯНИЕ УВЛАЖНЕНИЯ И ГИДРОФИЛИЗАЦИИ СПЕКАЕМОГО ПОЛИМЕРА, НА ПАРАМЕТРЫ ПОВЕРХНОСТНО-СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ, С.А.Минаева, Е.Н.Антонов, Л.И. Кротова, Е.М.Лялина, В.К.Попов. .... 438	438
INFLUENCE OF HYDROPHILICITY AND HUMIDIFICATION OF SINTERED POLYMER ON SURFACE-SELECTIVE LASER SINTERINGPARAMETERS, S.A.Minaeva, E.N. Antonov, L.I. Krotova, E.M Lyalina, V.K. Popov. .... 440	440
3. НА ПУТИ К БИОФАБРИКАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ (ТИК) ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ЩЖ): ФОРМИРОВАНИЕ И «ПОЧКОВАНИЕ» ТИРЕОИДНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ (ТФ) IN VITRO В 3Д-ГИДРОГЕЛЕ НА ОСНОВЕ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ (ЛТ) ЧЕЛОВЕКА, Н.С.Сергеева, Ю.Д.Хесуани, В.А.Кирсанова, И.К.Свиридова, П.А.Никифорович, А.П.Поляков ..... 441	441
TOWARDS BIOFABRICATION OF FUNCTIONAL HUMAN THYROID GLAND BIOENGINEERED CONSTRUCT: FORMATION OF HUMAN THYROID FOLLICLES (TF) AND BUDDING FOLLICULOGENESIS WITHIN 3D PLATELET LYSATE-BASED HYDROGEL, N.S.Sergeeva, Y.D.Khesuani, E.A.Bulanova, E.V.Koudan, V.A.Kirsanova, I.K.Sviridova, P.A.Nikiforovich, A.P.Polyakov ..... 442	442
4. ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА СКАФФОЛДОВ С ПРОГРАММИРУЕМЫМИ СВОЙСТВАМИ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНО-СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ, Чурбанов С.Н., Минаев Н.В., Антонов Е.Н., Джояшвили Н.А., Рочев Ю.А., Тимашев П.С. .... 443	443
SYNTHESIS FEATURES OF SCAFFOLDS WITH PROGRAMMABLE PROPERTIES BY THE METHOD FOR SURFACE-SELECTIVE LASER SINTERING, Churbanov S.N., Minaev N.V., Antonov E.N., Dzhoyashvili N.A., Rochev U.A, Timashev P.S. .... 444	444
5. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ В ПРОЦЕССЕ АНТИСОЛЬВЕНТНОЙ ТРЁХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ АЛИФАТИЧЕСКИМИ ПОЛИЭФИРАМИ, А.О.Мариянац, А.В.Миронов, О.А.Миронова, М.А.Сячина, В.К.Попов ..... 445	445
PECULIARITIES OF STRUCTURAL FORMATION IN THE PROCESS OF ANTISOLVENT THREE-DIMENSIONAL PRINTING OF ALIPHATIC POLYESTERS, A.Mariyanac, A.Mironov, O.Mironova, M.Syachina, V.Popov ..... 446	446
6. ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРНЫХ КУЛЬТУР В ТЕСТЕ МИКРОЦИТОТОКСИЧНОСТИ, Е.В.Пименова ..... 447	447
THE USE OF CONTINUOUS CELL LINES OF HUMAN ORIGIN AS INDICATOR OF THE CULTURES IN THE TEST OF MICROCYTOTOXICITY, E.Pimenova ..... 448	448
7. ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛАЗЕРНОЙ ИНЖЕНЕРИИ МИКРОБНЫХ СИСТЕМ (ЛИМС) ДЛЯ АКТИВАЦИИ РОСТА РЕДКИХ И ТРУДНОКУЛЬТИВИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, Чурбанова Е. С., Чепцов В.С., Жигарьков В.С., Юсупов В.И., Горленко М.В., Минаев Н.В., Чутко Е.А., Баграташвили В.Н. .... 449	449
APPLICATION OF THE TECHNOLOGY OF LASER ENGINEERING OF MICROBIAL SYSTEMS (LEMS) TO ACTIVATE THE GROWTH OF RARE AND HARD-CULTIVATED MICROORGANISMS, Churbanova E.S. , Cheptsov V.S. , Zhigarkov V.S. , Yusupov V.I. , Gorlenko M.V. , Minaev N.V. , Chutko E.A. , Bagratashvili V.N. .... 450	450

УДК: 577.29, ББК: 28.070

## АКТИВНОСТЬ ИЗОФОРМ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ И ОСТЕОАРТРИТЕ

 А.В.Попов<sup>1</sup>, Д.И.Козлова<sup>1</sup>, П.А.Игнатъева<sup>2</sup>, М.Ф.Баллюзек<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО "Научно-производственная фирма "АБРИС+", Россия, 196084, Санкт-Петербург, Цветочная, 16, popovsh@yandex.ru, +79111504782

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения Санкт-Петербургская клиническая больница Российской академии наук, Россия, 194017, Санкт-Петербург, пр. Тореца, 72, marina.ballyzek@mail.ru, +78123234535

Показано, что при ревматоидном артрите возрастает активность типичной и минорных форм бутирилхолинэстеразы, тогда как при остеоартрите наблюдается небольшой рост активности типичной формы, которая практически не отличалась от показателей контрольной группы.

**Ключевые слова:** Бутирилхолинэстераза, ревматоидный артрит, остеоартрит, плазма крови

Ревматоидный артрит (РА) – системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением суставов и других органов. В мире, им страдают более 113 миллионов человек [1]. РА способен к симптоматической мимикрии с заболеваниями другой этиологии, особенно на ранних стадиях. Одним из них является остеоартрит. Для своевременного лечения данного заболевания необходима точная и ранняя диагностика. Точно диагностировать РА помогают специфические биомаркеры, в качестве которых в настоящий момент используются антитела к циклическим цитруллинированным пептидам (анти-ЦЦП), ревматоидный фактор (РФ), а также неспецифические маркеры воспаления, такие как С-реактивный белок (СРБ) и скорость оседания эритроцитов (СОЭ) [1]. Однако, известно, что в плазме крови 37% пациентов даже на поздних стадиях заболевания они не выявляются. Именно поэтому во всем мире в настоящий момент ведется поиск новых биомаркеров, которые бы позволяли точно и на ранних стадиях определить РА, а также отделить его от других заболеваний. Ранее, нами было продемонстрировано, что возможным маркером аутоиммунного воспаления может являться активность бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) плазмы крови, которая повышается при аутоиммунных патологиях, а при заболеваниях иной природы остается на контрольном уровне [2]. Из литературных данных известно, что кроме типичной формы БуХЭ, устойчивой к ингибированию тизанидином, существует также атипичная форма, устойчивая к хлориду суксаметония, и минорные изоформы, сохраняющие активность в присутствии обоих указанных ингибиторов [3]. Целью данной работы было определение активности тех изоформ БуХЭ, которые обуславливают повышение общей активности данного фермента при ревматоидном артрите и изменения, характерные для остеоартрита.

В данном исследовании принимали участие пациенты следующих групп: пациенты без нарушений опорно-двигательного аппарата (КГ, n = 10); пациенты с недифференцированным периферическим артритом (НПА, n = 7); пациенты с ревматоидным артритом, длительностью более двух лет (РА, n = 9); пациенты с диагнозом остеоартрит (ОА, n = 5). Все пациенты или их представители дали информированное согласие на участие в исследовании. Для выделения плазмы, образцы крови, забранные в вакуумные пробирки с напылением литий-гепарина, центрифугировали при 20000g в течение 15 минут при 20°C. Пробы нормировали по белку с использованием метода М.М. Брэдфорд [4]. Измерение активности форм БуХЭ проводилось модифицированным методом Элмана [5], в сочетании с ингибиторным анализом. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы Microsoft Office Excel 2010 с надстройками для проведения дисперсионного анализа ANOVA. Результаты представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего. Достоверность отличий оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента и различия считались значимыми при p ≤ 0,05.

Результаты нашего исследования продемонстрировали, что активность типичной формы БуХЭ у пациентов группы РА (0,0692 ± 0,0001 нмоль субстрата/мг/мин) примерно в 1,8 раза выше, чем у КГ (0,0390 ± 0,0002) и групп ОА (0,0473 ± 0,0001) и НПА (0,0648 ± 0,0001). Активность атипичной формы у всех исследованных групп не регистрировалась, что полностью согласуется с данными [1]. Активность минорных форм БуХЭ не регистрировалась в КГ и ОА, в то время как при НПА их активность резко возрастает и достигает 0,0863 ± 0,0001; при РА их активность в 2 раза ниже (0,0395 ± 0,0001), чем при НПА, однако остается достаточно высокой. Это свидетельствует о том, что изменение общей активности БуХЭ при ревматоидном артрите происходит за счет увеличения типичной и минорных изоформ данного фермента, при этом

активность типичной формы выше, чем таковая у минорных форм, тогда как при подозрении на ревматоидный артрит увеличение общей активности происходит за счет существенного увеличения активности минорных форм, которая превышает активность типичной формы почти в полтора раза.

На основании полученных данных, можно сделать вывод о том, что наибольшую диагностическую ценность для определения РА и НПА имеет не только изменение активности типичной и минорной форм БУХЭ, но и их соотношение, а ОА достаточно легко отделить от НПА, поскольку при данном заболевании полностью отсутствует активность минорных форм. Результаты проведенного исследования положены в основу создания теста для ранней и точной диагностики РА.

#### Литература:

1. Руководство по аутоиммунным заболеваниям для врачей общей практики / Под ред. И. Шенфельда и соавт. – СПб.: Медкнига «ЭЛБИ». – 2017. – 416 с. 2. Козлова Д.И., Попов А.В. Бутирилхолинэстераза как потенциальный биомаркер аутоиммунных заболеваний // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды»: тезисы докл. (Москва, 18-22 сентября 2017). – М., 2017. – С. 74. 3. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2015. – №148. – P. 34-46 4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – №72. – P. 248-254. 5. Ellman G.L., Courtney K.D., Andreas V.J., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem Pharmacol.* – 1961. – №7. – P. 88-95.

**Финансирование:** Работа выполнена исключительно за счет собственных средств ООО "НПФ "АБРИС+"

UDC 577.29, BBC 28.070

## BUTYRYLCHOLINESTERASE ISOFORMS ACTIVITY IN RHEUMATOID AND OSTEOARTHRITIS

A.Popov <sup>1</sup>, D.Kozlova <sup>1</sup>, P.Ignatyeva <sup>2</sup>, M.Balluzek <sup>2</sup>

<sup>1</sup> LTD "Scientific and Production Company "ABRIS+", Russia, 196084, Saint Petersburg, Cvetochnaya, 16

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Healthcare Institution St. Petersburg Clinical Hospital of the Russian Academy of Sciences, Russia, 194017, Saint Petersburg, pr. Toreza, 72

It is shown that in rheumatoid arthritis the activity of the typical and minor butyrylcholinesterase forms increases, whereas in osteoarthritis there is a slight increase only in typical form activity, which did not differ from that in the control group.

**Key words:** Butyrylcholinesterase, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, blood plasma

Rheumatoid arthritis (RA) is a systematic autoimmune disorder that causes the inflammation of joints and other areas of the body. More than 113 million people all around the world are suffering from it [1]. RA could show the symptomatic mimicry with the other etiology diseases, especially on early stages. One of them is osteoarthritis. The prompt treatment of this disease requires acute and early diagnostics. To diagnose RA accurately specific biomarkers are used: antibodies to cyclic citrullinated peptides (anti-CCP), rheumatoid factor (RF) and also nonspecific markers of inflammation such as C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) [1]. However, it is known, that in blood plasma of 37% patients they are not found even on the late stages of disease. That is why all around the world is conducted the search of new biomarkers that could acute determine RA on early stages and separate it from other disorders. Earlier, we have shown that the possible marker of autoimmune inflammation could be blood plasma butyrylcholinesterase (BCHE) activity that increases in autoimmune pathologies while in other diseases it stays on the control level [2]. From the literature, it is known, that instead of typical BCHE form that is resistant to inhibition by tizanidine, there is also atypical isoform that is resistant to suxamethonium chloride and minor isoforms that retain activity in the presence of both inhibitors [3]. The aim of this study was to determine the activity of those BCHE isoforms, which cause the increase of the general activity of this enzyme in rheumatoid arthritis and their changes that are characteristic of osteoarthritis.

In this research take part the following groups of patients: patients without disorders of the musculoskeletal apparatus (CG; n = 10); patients with undifferentiated peripheral arthritis (UPA; n = 7); patients with rheumatoid arthritis (duration more than two years) (RA; n = 9); patients with osteoarthritis (OA; n = 5). All patients or their representatives give informed consent for participation in the study. For plasma separation, blood samples taken in vacutainer tubes coated with lithium-heparin are centrifuged at 20000g for 15 minutes at 20°C. Samples are



normalized by protein using the M. M. Bradford's method [4]. Measurement of BCHE forms activity is conducted by the modified Ellman's method combined with inhibition analysis [5]. Statistical analysis of obtained data is performed using Microsoft Office Excel 2010 with add-ins to conduct ANOVA analysis. The results are presented as mean values  $\pm$  standard deviation. The reliability of differences is assessed using Student's t-test and differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

The results of our study demonstrate that in RA patients group the activity of typical BCHE form is about 1.8 times higher ( $0,0692 \pm 0,0001$  nmol substrate/mg/min) than that in CG ( $0,0390 \pm 0,0002$ ), OA ( $0,0473 \pm 0,0001$ ) and UPA ( $0,0648 \pm 0,0001$ ) groups. In all studied groups the activity of atypical form is not recorded, that fully corresponds with the literature data [1]. The minor BCHE isoforms activity is not registered in CG and OA while in UPA it extremely increases and reaches  $0,0863 \pm 0,0001$ ; in RA their activity is two times lower ( $0,0395 \pm 0,0001$ ) than that in UPA but it still stays rather high. This suggests that the general BCHE activity in rheumatoid arthritis changes due to the increase of the typical and minor isoforms of this enzyme, while the typical form activity is higher than the minor isoforms activity. At the same time, in suspected rheumatoid arthritis patients the general activity increases due to significant increase of minor isoforms activity, which is about two times higher than the typical isoform activity.

Based on received data, we can conclude that the greatest diagnostic value in RA and UPA determination is not only the change in the activity of the typical and minor BCHE forms, but their ratio. OA is easy enough to separate from the UPA, since in this disease is completely absent activity of the minor forms. The results of the study form the basis of a test for early and accurate diagnostics of RA.

#### References:

1. *Rukovodstvo po autoimmunnym zabolevaniyam dlya vrachej obshchej praktiki / Pod red. I. SHenfel'da i soavt. – SPb.: Medkniga «EHLBI». – 2017. – 416 s. 2. Kozlova D.I., Popov A.V. Butirilholinehsteraza kak potencial'nyj biomarker autoimmunnyh zabolevanij // Mezhdunarodnaya nauchnaya konferenciya po bioorganicheskoj himii «XII chteniya pamyati akademika YU.A. Ovchinnikova i VIII Rossijskij simpozium «Belki i peptidy»: tezisy dokl. (Moskva, 18-22 sentyabrya 2017). – M., 2017. – S. 74. 3. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2015. – №148. – R. 34-46 4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – №72. – R. 248-254. 5. Ellman G.L., Courtney K.D., Andreas V.J., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem Pharmacol.* – 1961. – №7. – R. 88-95.*

**Grant:** This work is performed solely at the expense of own means of Ltd "SPC "ABRIS+"

УДК 539.12.04

## ВЛИЯНИЕ УВЛАЖНЕНИЯ И ГИДРОФИЛИЗАЦИИ СПЕКАЕМОГО ПОЛИМЕРА, НА ПАРАМЕТРЫ ПОВЕРХНОСТНО-СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ

**С.А.Минаева, Е.Н.Антонов, Л.И. Кротова, Е.М.Лялина, В.К.Попов.**

ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия  
 108840 г. Москва, г. Троицк, ул. Пионерская, д. 2.  
 e-mail: minaeva.svetlana@gmail.com

Изучено влияние предварительной гидрофилизации поверхности и условий увлажнения исходных порошков биорезорбируемых полимеров на пространственно-временное распределение температуры в рабочем слое и характеристики процесса их поверхностно-селективного лазерного спекания с использованием воды в качестве сенсбилизатора нагрева.

**Ключевые слова:** матриксы для тканевой инженерии; селективное лазерное спекание; тепловизор; алифатические полиэферы; гидрофилизация.

Исследован процесс поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС) мелкодисперсных (размер частиц 50-100 мкм) порошков полилактогликолидов PDLG7507 (Puras, Biochembv, Нидерланды) с использованием воды в качестве сенсбилизатора нагрева. Для спекания использовалось излучение тулиевого лазера с длиной волны 1,94 мкм (ИРЭ-Полус), которое слабо (кпогл.  $\sim 1$  см<sup>-1</sup>) поглощается полимером, в то время как вода имеет сильную полосу поглощения (кпогл.  $\sim 100$  см<sup>-1</sup>) в этой области. Поверхность частиц полимера была гидрофилизирована с помощью 1% водного раствора альгината натрия.

Из частиц полимера формировался слой толщиной 2 мм, на который осуществлялось нанесение водного аэрозоля с помощью ультразвукового увлажнителя воздуха (Stadler Form Jack J-020, Швейцария) в течение 10, 30, 60 или 120 секунд. Затем порошок точно подвергался лазерному воздействию мощностью 3 Вт, за времена от 2 до 50 мсек.

С помощью тепловизионной камеры FLIR (A600-series, США) исследованы кинетика и пространственное распределение температуры для частиц порошка полимера в зоне лазерного воздействия в зависимости от параметров спекания и условий смачивания. Зависимости распределения температуры вдоль линии сечения, проходящей через точку спекания, от типа спекаемого порошка и от времени смачивания для длительности лазерного излучения 10 мсек, представлены на Рис.1 и Рис.2.

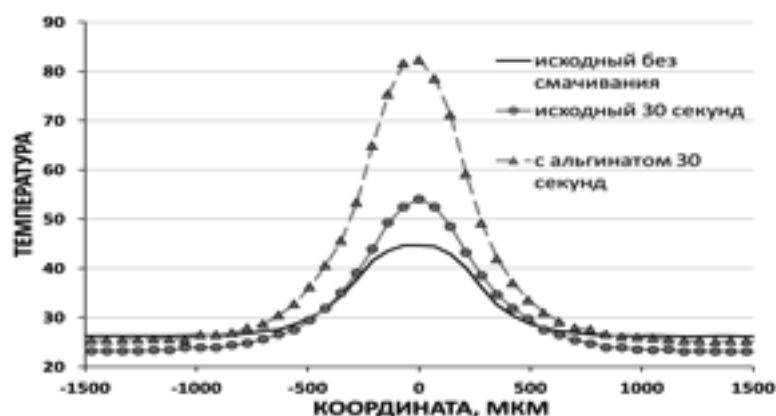


Рис.1. Распределение температуры в зоне лазерного воздействия для сухого исходного порошка и для исходного порошка и порошка, модифицированного альгинатом натрия, увлажненных в течение 30 сек.

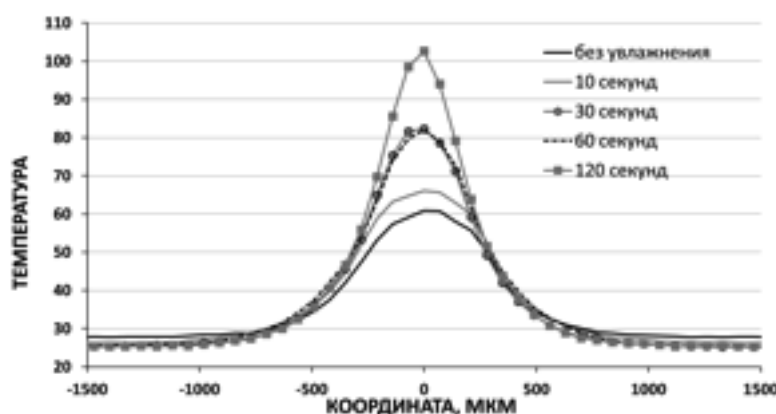


Рис.2. Зависимость распределения температуры в зоне лазерного воздействия от времени увлажнения для полилактогликолида с покрытием из альгината натрия.

Проведенные исследования показали, что температура в зоне воздействия лазерного излучения растет с увеличением времени увлажнения. Причем, для полимерных частиц с гидрофильным покрытием этот рост более значительный по сравнению с частицами без покрытия. Увлажнение частиц полимера обеспечивает более эффективное поглощение лазерной энергии и более высокую температуру нагрева поверхности частиц по сравнению с температурой внутри их объема. Таким образом, спекание полимерных частиц может происходить за счет плавления только поверхностных слоев частиц полимера, без перегрева их внутреннего объема.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФАНО (соглашение №007-ГЗ/Ч3363/26) в части разработки установки СЛС и РФФИ (Проект № 16-02-00473) в части проведения исследований температурных полей при лазерном нагреве

UDC 539.12.04

## INFLUENCE OF HYDROPHILICITY AND HUMIDIFICATION OF SINTERED POLYMER ON SURFACE-SELECTIVE LASER SINTERING PARAMETERS

S.A.Minaeva, E.N. Antonov, L.I. Krotova, E.M Lyalina, V.K. Popov.

FRC "Crystallography and Photonics" RAS, Moscow, Russia  
 108840 Moscow, Troitsk, Pionerskaya str. 2.  
 e-mail: minaeva.svetlana@gmail.com

The influence of surface hydrophilicity and humidification conditions of bioresorbable polymer powders on the space-time temperature distribution in the sintered layer and the characteristics of the process surface-selective laser sintering using water as the sensitizer of heating have been studied.

**Key words:** matrixes for tissue engineering; selective laser sintering; thermal imaging; aliphatic polyesters; hydrophilization.

The process of surface-selective laser sintering (SSLS) of fine dispersive poly(lactoglycolides) (PDLG7507, Purac, Biochem bv, The Netherlands) powders (particle size 50-100  $\mu\text{m}$ ) using water as the sensitizer of heating was studied. The thulium laser with 1.94  $\mu\text{m}$  wavelength (IPG Photonics) which radiation is poorly absorbed by the polymer ( $\mu \sim 1 \text{ cm}^{-1}$ ), while water has a strong absorption band in this region ( $\mu \sim 100 \text{ cm}^{-1}$ ) was used for sintering. The surface of the polymer particles was hydrophilized with a 1% aqueous solution of sodium alginate. A 2 mm thick layer was formed from the polymer particles, on which an aqueous aerosol was applied using an ultrasonic air humidifier (Stadler Form Jack J-020, Switzerland) during 10, 30, 60 or 120 seconds. Then pointwise the powder was laser-exposed to a laser power of 3 W, for times of 2 to 50 ms.

A 2 mm thick layer was formed from the polymer particles and was sprayed by aqueous aerosol with an ultrasonic air humidifier (Stadler Form Jack J-020, Switzerland) for 10, 30, 60 or 120 seconds. Then, the powder was sintered by laser with 3 W powers and from 2 to 50 msec irradiation times.

Using the FLIR thermal imaging camera (A600-series, USA), the kinetics and spatial distribution of temperature for polymer powder particles in the laser exposure zone were studied depending on the sintering parameters and wetting conditions. Dependences of the temperature distribution along the sectional line passing through the sintering point, on the type of sintered powder and on the time of wetting for laser radiation duration of 10 msec, are shown in Fig. 1 and Fig. 2.

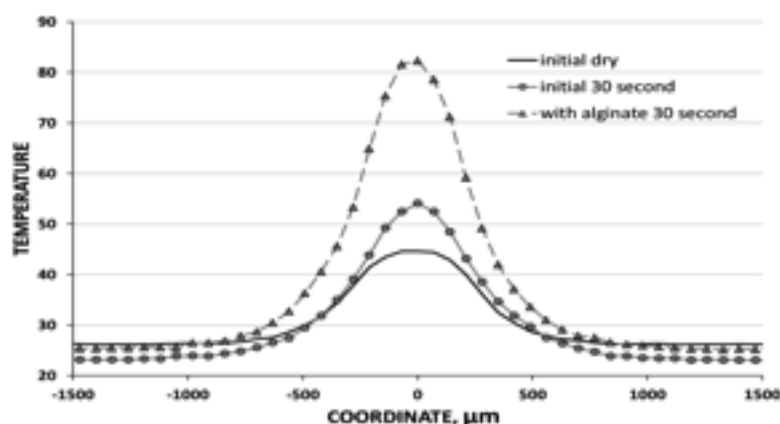


Fig.1. Temperature distribution in the region of the laser exposure zone for original dry powder and for the original powder and the powder, modified with sodium alginate, wetted for 30 sec.

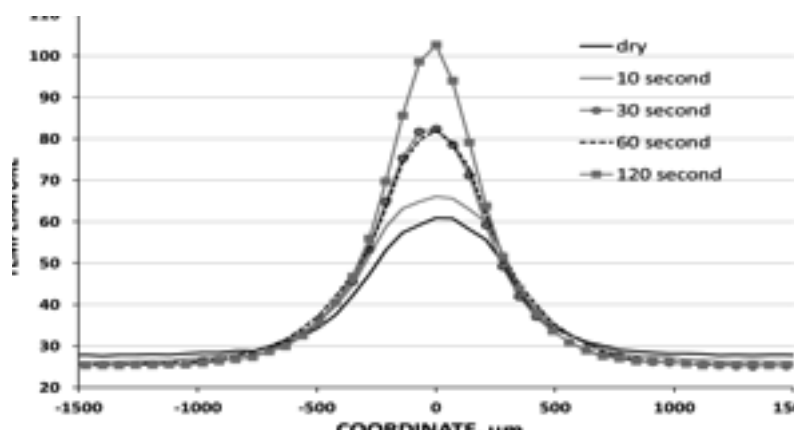


Fig.2. Dependence of the temperature distribution in the laser exposure zone from the time of humidification for polylactoglycolide powder coated with sodium alginate.

The carried out investigations have shown that the temperature in the zone of laser radiation action increases with the time of humidification. Moreover, for polymeric particles with hydrophilic coating this growth is more significant in comparison with uncoated particles. Humidification of the polymer particles provides a more efficient absorption of laser energy and a higher surface heating temperature of the particles compared to the temperature within their volume. Thus, sintering of polymer particles can occur due to the melting of only the surface layers of polymer particles, without overheating their internal volume.

This work was supported by the FASO (Agreement No 007-ГЗ/Ч3363/26) in the part of development of SLS system and by RFBR (Grant No 16-02-00473) in the part of studies of thermal fields caused by laser heating

УДК 57.085.23

## НА ПУТИ К БИОФАБРИКАЦИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ (ТИК) ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ЩЖ): ФОРМИРОВАНИЕ И «ПОЧКОВАНИЕ» ТИРЕОИДНЫХ ФОЛЛИКУЛОВ (ТФ) IN VITRO В 3D-ГИДРОГЕЛЕ НА ОСНОВЕ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ (ЛТ) ЧЕЛОВЕКА

Н.С.Сергеева<sup>1</sup>, Ю.Д.Хесуани<sup>2</sup>, В.А.Кирсанова<sup>1</sup>, И.К.Свиридова<sup>1</sup>, П.А.Никифорович<sup>1</sup>, А.П.Поляков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ЧУ «ЗД-Биопринтинг Солюшенс», Москва, Россия  
125284, Россия, Москва, 2-й Боткинский пр., д.3  
e-mail: prognoz.06@mail.ru

В докладе будут представлены данные по разработке метода долгосрочного культивирования и наращивания тиреоидных фолликулов человека на границе раздела сред воздух/биоактивный гидрогель на основе лизата тромбоцитов доноров. Делается вывод о том, что разработанный подход является перспективным для последующей биофабрикации тканеинженерных конструкций щитовидной железы.

**Ключевые слова:** щитовидная железа, культивирование in vitro, тиреоциты, тиреоидные фолликулы

Альтернативой заместительной гормонотерапии больных после тиреоидэктомии могла бы стать имплантация функционально полноценных ТИК ЩЖ. Первым этапом решения этой проблемы является разработка методологии получения, культивирования и масштабирования ТЦ и/или ТФ из ткани ЩЖ.

разработка методики выделения и способов культивирования ТЦ и ТФ из ткани ЩЖ человека в 3D-гидрогеле на основе ЛТ человека.

Микроорганнне культуры (n=18) и ТФ (n=6) получали путем механической дезагрегации ткани нормальной ЩЖ после тиреоидэктомии по поводу рака с последующим фильтрованием через серию сит с разным значением меш.

ТФ и микроорганнне культуры культивировали (до 5 месяцев) в трансвеллах, на границе раздела воздух-гель в биоактивном гидрогеле, содержащем спектр гормонов и факторов роста, периодически меняя среду и добавляя свежие порции гидрогеля. Оценивали распределение фолликулов по размерам в ди-

намике культивирования (прижизненно, путем фотодокументирования с последующей морфометрией), долю контактирующих фолликулов, жизнеспособность одиночных ТЦ и ТЦ в ТФ (окраска DiI, MTT), долю Ki-67-позитивных клеток и Oct3/4 стволовых клеток.

Установлено, что в первую неделю в микроорганической культуре пролиферирующие клетки отсутствуют, и к 7-му дню значительная часть одиночных ТЦ погибает. Однако через 2 недели среди выживших ТЦ визуализируются Ki-67+ и Oct3/4+ клетки. Далее ТЦ начинают образовывать ассоциаты, которые постепенно превращаются в ТФ с правильной полярностью клеток, накоплением в них секрета и наличием Ki-67-позитивных и редких Oct3/4-позитивных клеток.

В ТФ, выделенных из ткани ЩЖ в сходной системе – в гидрогеле на границе раздела сред – ТЦ сохраняют жизнеспособность, среди них появляются Ki-67-позитивные клетки. В динамике культивирования ТФ увеличивается количество межфолликулярных контактов мелких и крупных фолликулов и доля мелких фолликулов (картина, морфологически сходная с «почкованием»).

Биоактивный гидрогель на основе компонентов крови доноров является перспективным 3D-скаффолдом для культивирования и наращивания ТЦ и ТФ, пригодных для последующей биофабрикации ТИК ЩЖ.

УДК 57.085.23

## TOWARDS BIOFABRICATION OF FUNCTIONAL HUMAN THYROID GLAND BIOENGINEERED CONSTRUCT: FORMATION OF HUMAN THYROID FOLLICLES (TF) AND BUDDING FOLLICULOGENESIS WITHIN 3D PLATELET LYSATE-BASED HYDROGEL

N.S.Sergeeva <sup>1</sup> Y.D.Khesuani <sup>2</sup> E.A.Bulanova <sup>2</sup> E.V.Koudan <sup>2</sup> V.A.Kirsanova <sup>1</sup> I.K.Sviridova <sup>1</sup> P.A.Nikiforovich <sup>1</sup> A.P.Polyakov <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Laboratory for Biotechnological Research «3D Bioprinting Solutions», Moscow, Russian Federation  
 3, 2nd Botkinsky pass., Moscow, 125284, Russia  
 e-mail: prognos.06@mail.ru

The report will present data on the development of a method for the long-term cultivation and processing of human thyroid follicles at the air / bioactive donor platelet lysate hydrogel interface. It is concluded that the developed approach is promising for the subsequent biofabrication of tissue engineering constructions of the thyroid gland.

**Key words:** Thyroid gland, in vitro cultivation, thyrocyte, thyroid follicles.

The grafting of functional thyroid gland bioengineered construct is a promising alternative to synthetic hormone replacement therapy for hypothyroid patients. The reproducible procedure for dissection, appropriate propagation and scaling up of thyrocytes and thyroid follicles from human thyroid tissue explants is an initial significant step in this direction.

The aim is to develop the method for dissection of thyrocytes and thyroid follicles from human tissue explants and to establish the procedure for their subsequent cultivation within 3D human platelet lysate-based hydrogel.

We used normal non-affected human thyroid tissue from patients who underwent cancer thyroidectomy to obtain micro organ cultures (n=18) and thyroid follicles (n=6). The tissue was further minced with a scalpel and filtered through sieves with decreasing mesh size.

TF and micro organ cultures were kept in transwells systems for up to 5 months on the air-hydrogel border. Bioactive hydrogel was enriched with growth factors and hormones. The culture medium was replaced and bioactive hydrogel was vivified during the maintenance. TF diameter and growth dynamics were assessed by morphometry. Additionally, we determined thyrocytes viability per se and within TF by DiI and MTT methods, TFs in contact, Ki-67 positive and Oct3/4-positive stem cells.

Results. We didn't detect any proliferating cells during the first week in the culture, by the 7th day we observed a massive thyrocytes loss. However surviving thyrocytes start to express Ki-67 and Oct3/4 in two weeks. Further individual cells associate producing TF with appropriate thyrocytes polarity and containing colloid in their lumen. Ki-67-positive and random Oct3/4-positive cells appeared.

Thyrocytes within dissected TF, which were also maintained on the air-hydrogel border were viable, some of them displayed Ki-67 positive cells. Afterwards we observed clustering of large and small TFs. Additionally, the

percent of small TFs was expanding, which could suggest ongoing budding folliculogenesis.

Bioactive 3D human platelet lysate-based hydrogel represents a promising 3D scaffold for thyrocytes and TFs suitable for subsequent biofabrication of human thyroid gland construct.

УДК 615.461

## ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА СКАФФОЛДОВ С ПРОГРАММИРУЕМЫМИ СВОЙСТВАМИ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНО-СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО СПЕКАНИЯ

Чурбанов С.Н., Минаев Н.В., Антонов Е.Н., Джояшвили Н.А., Рочев Ю.А., Тимашев П.С.

Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет.  
Институт фотонных технологий, ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН  
119048, Москва, Трубевская улица д.8  
e-mail: Churbanov.semyon@gmail.com

Методом поверхностно-селективного лазерного спекания получены трехмерные структуры, представляющие собой полимерные матриксы, обладающие контролируемыми физико-химическими свойствами и высокой биосовместимостью.

**Ключевые слова:** регенеративная медицина, полилактид, поверхностно-селективное лазерное спекание, тканевая инженерия.

Метод селективного лазерного спекания (СЛС) разработанный в середине 80х годов двадцатого века лишь в 2000-ых годах обратил на себя внимание научных коллективов из отрасли регенеративной медицины из-за своей высокой точности, производительности, а также возможности использования широкого круга твердых порошковых материалов [1]. В настоящее время выпускаются материалы, одобренные для использования в качестве клеточных носителей. Однако методы структурирования таких материалов, которые не приводят к изменению его химический состава и позволяют создавать трехмерные тканеинженерные конструкции, очень ограничены [2].

При дальнейшем развитии метода СЛС, был предложен подход, при котором использовалось лазерное излучение которое слабо поглощалось основным материалом спекаемого порошка, а основная энергия лазерного излучения поглощалась специальной добавкой – сенсбилизатором, поглощающим на порядки больше энергию. При этом, основная масса порошкового материала не претерпевает значительных тепловых нагрузок и фазовых переходов, и, как следствие, не меняет свой химический состав. Различные коллективы предлагали к использованию разнообразные вещества для реализации этой концепции, например сажу [3], хорошо поглощающую излучение Nd:YAG лазера или наночастицы благородных металлов. Такой подход позволяет получать трехмерные скаффолды с заданной архитектурой, спроектированной в CAD программном обеспечении.

Однако, у таких материалов существуют проблемы с биосовместимостью: частицы сенсбилизатора попадая в кровеносную систему пациента вызывают различные осложнения. Для решения этой проблемы в нашей организации была предложена концепция поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС) с использованием воды в качестве сенсбилизатора нагрева. Для этого использовалось излучение инфракрасного лазера с длинной волны 1,9мкм, попадающее в полосу интенсивного поглощения воды. Частицы воды наносились на поверхность порошкового материала с помощью аэратора. В процессе спекания вода, поглощая лазерное излучение, передает часть тепловой энергии приповерхностным зонам частиц спекаемого порошка, за счет чего происходит их спекание.

**Благодарности:** Работа поддержана проектом ФАНО № 007-GZ/C3363/26 (в части анализа химических и физических свойства напечатанных тканеинженерных конструкций) и проектом РФФИ № 16-02-00473 (в части разработки технологии биопринтинга).

Литература:

- [1] Sabir M. I., Xu X., Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications // *Journal of materials science*. – 2009. – Т. 44. – №. 21. – С. 5713-5724.
- [2] Liu X., Ma P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering // *Annals of biomedical engineering*. – 2004. – Т. 32. – №. 3. – С. 477-486.
- [3] Wagner T. et al. Laser sintering of high temperature resistant polymers with carbon black additives // *International Polymer Processing*. – 2004. – Т. 19. – №. 4. – С. 395-401.

UDC 615.461

## SYNTHESIS FEATURES OF SCAFFOLDS WITH PROGRAMMABLE PROPERTIES BY THE METHOD FOR SURFACE-SELECTIVE LASER SINTERING

Churbanov S.N., Minaev N.V., Antonov E.N., Dzhoyashvili N.A., Rochev U.A., Timashev P.S.

*Institute for Regenerative medicine, Sechenov University.  
 Institute for photon technology, FSRC "Crystallography and photonics" RAS  
 119048, Moscow, Trubetskaya street, 8  
 e-mail: Churbanov.semyon@gmail.com*

The application of surface-selective laser sintering allowed creating 3D structures. Such structures represent polymer matrices with controlled physicochemical properties and high biocompatibility.

**Key words:** regenerative medicine, polylactide, surface-selective laser sintering, tissue engineering.

The method of laser sintering (SLS) was developed in the middle 80s of the twentieth century but it was admitted by the scientific society in the field of regenerative medicine only in the 2000s. It happened due to its high accuracy, performance, and the possibility of using a wide range of solid powder materials [1]. Nowadays, we already have some materials approved as cellular carriers. However, the methods for structuring such materials without changing materials' chemical composition but with the creation of three-dimensional tissue engineering constructs are very limited [2].

Further development of SLS led to the approach which applied laser radiation with weak absorption by sintered powder, while the main energy of laser radiation was absorbed by the special additive, sensitizer, with the ability to absorb orders of magnitude more energy. In this case, the bulk of the powder material does not undergo significant thermal loads and phase transitions, and, as a consequence, does not change its chemical composition. Various teams proposed to use a variety of substances to implement this concept, for example, carbon black [3], which strongly absorbs the radiation of an Nd: YAG laser, or nanoparticles of noble metals. This approach allows obtaining three-dimensional scaffolds with a defined architectonics designed in CAD software.

However, such materials have problems with biocompatibility: the sensitizer particles enter the circulatory system of the patient and cause various complications. To solve this problem, the concept of surface-selective laser sintering (SSLS) using water as a sensitizer for heating was proposed in our organization. To do this, we used infrared laser radiation with a wavelength of 1.9  $\mu\text{m}$ , which is well absorbed by water. Water particles were applied to the surface of the powder material using an aerator. During sintering, water absorbs laser radiation and transfers a part of the thermal energy to the surface the sintered powder, which conditions sintering.

Thanks:

The work was supported by the FASO project No. 007-GZ / C3363 / 26 (regarding the analysis of the chemical and physical properties of the printed fabric engineering designs) and the RFFR project No. 16-02-00473 (regarding the development of bioprinting technology).

References:

- [1] Sabir M. I., Xu X., Li L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications // *Journal of materials science*. – 2009. – T. 44. – №. 21. – С. 5713-5724.
- [2] Liu X., Ma P. X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering // *Annals of biomedical engineering*. – 2004. – T. 32. – №. 3. – С. 477-486.
- [3] Wagner T. et al. Laser sintering of high temperature resistant polymers with carbon black additives // *International Polymer Processing*. – 2004. – T. 19. – №. 4. – С. 395-401.

УДК 66.081.6

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ В ПРОЦЕССЕ АНТИСОЛЬВЕНТНОЙ ТРЁХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ АЛИФАТИЧЕСКИМИ ПОЛИЭФИРАМИ

Мариянац А.О., Миронов А.В., Миронова О.А., Сячина М.А., Попов В.К.

Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук, Москва, Россия  
142190, г. Москва, г. Троицк, ул. Пионерская, д. 2  
e-mail: amariyanac@mail.ru

Методом лазерной рефрактометрии исследованы диффузионные процессы в модельных системах на основе алифатических полиэфиров, тетрагликоля и водосодержащих сред, предназначенных для антисольвентной 3D печати. Изучено влияние этих процессов на особенности формирования микро- и макроструктур создаваемых трехмерных объектов.

**Ключевые слова:** биорезорбируемые полимерные матрицы, тканевая инженерия, 3D печать, алифатические полиэфиры.

Антисольвентная 3D печать представляет собой аддитивный метод формирования объемных структур (в частности, биodeградируемых матриц для тканеинженерных конструкций) из растворов различных веществ при экструзии последних в жидкую среду-антирастворитель. При этом происходит образование твердой фазы, микроструктура которой напрямую связана с интенсивностью и скоростью протекания диффузионных процессов в этой системе. Наши исследования проводились на модельных растворах полилактида в тетрагликоле (ТГ). В качестве антирастворителей использовались дистиллированная вода, а также водные растворы этилового спирта и/или глицерина.

Кинетику диффузии ТГ из раствора полимера в воду исследовали с помощью метода лазерной рефрактометрии. На графиках зависимости показателя преломления  $n$  от времени (Рис.1) для всех растворов полимеров можно выделить нестабильную (I) и стабильную области (II).

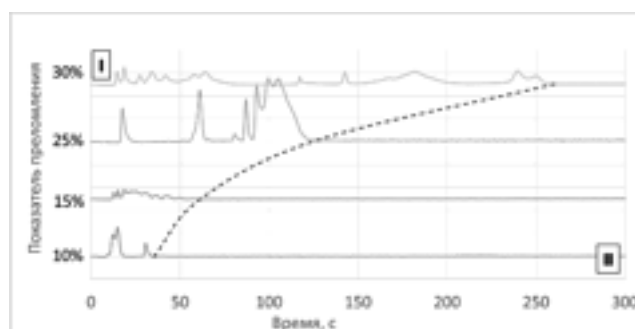


Рис.1. Временные зависимости изменения  $n$  системы в процессе диффузии ТГ из растворов полилактида ( $M_w = 52$ кДа) различных концентраций в воду. I – зона нестабильной диффузии, II – зона стабильной диффузии.

Протяженность нестабильной области увеличивается с ростом концентрации полимера в растворе. Отсутствие значимых изменений показателей преломления в линейной области свидетельствует о стабилизации скоростей диффузионных потоков, что, вероятно, связано с завершением формирования полимерной мембраны на границе раздела фаз полимер/антирастворитель.

Для изучения образующихся в модельной системе микро- и макроструктур в ходе трехмерной антисольвентной печати, на исследовательском 3D принтере, разработанном во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, были изготовлены образцы полиэфирных матриц, плёнок и волокон (Рис.2).

Срезы пленок (Рис.2.б) и волокон (Рис.2.в), а так же их поверхности изучены с помощью сканирующей электронной микроскопии. Регулярность структур, заметно нарушается при использовании в качестве антисольвента раствора глицерина или этилового спирта. Как в случае плёнок, так и в случае волокон характерный размер структуры напрямую зависит от вязкости исходного раствора полимера и скорости массообмена в системе полимер/ТГ/антирастворитель.



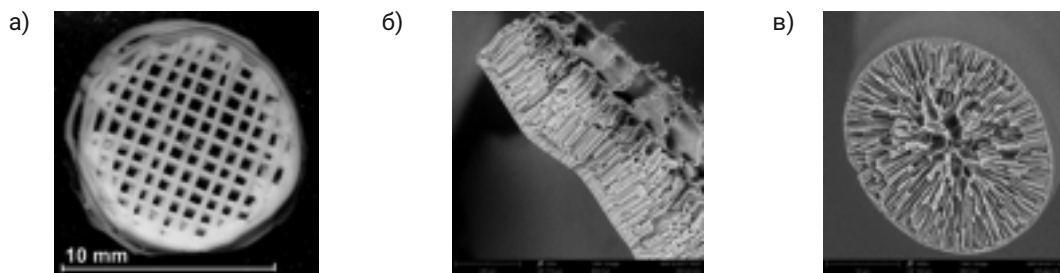


Рис.2. Изображения полилактидного матрикса (а), а также сечений пленки (б) и отдельного волокна (в). Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, проект № 16-29-11722.

Литература:

1. Mironov A.V., Grigoryev A.M., Krotova L.I., Skaletsky N.N., Popov V.K., Sevastianov V.I. 2017. 3D printing of PLGA scaffolds for tissue engineering // *J Biomed Mater Res Part A* 2017. Vol. 105A. №1. P. 104–109. UDC 66.081.6

## PECULIARITIES OF STRUCTURAL FORMATION IN THE PROCESS OF ANTISOLVENT THREE-DIMENSIONAL PRINTING OF ALIPHATIC POLYESTERS

Mariyanac A.O., Mironov A.V., Mironova O.A., Syachina M.A., Popov V.K.

Institute of Photonic Technologies, Federal Research Center "Crystallography and Photonics" Moscow, Russia  
 142190, Moscow, Troitsk, Pionerskaya str., 2  
 e-mail: amariyanac@mail.ru

Diffusion processes in polylactide-tetraglycol-precipitant model system for antisolvent three-dimensional printing were studied with the laser refractometry. The effects of these processes on the microstructure of formed 3D objects were shown.

**Key words:** bioresorbable polymeric scaffolds, tissue engineering, 3D printing, aliphatic polyesters

Antisolvent printing is an additive manufacturing method of three-dimensional objects (including bioresorbable scaffolds for tissue engineering constructs). The solid phase forms from polymer solution during solvent extraction using liquid antisolvent. The microstructure of obtained solid phase directly depends on intensity of the diffusion processes in three-phase system (polymer-solvent-antisolvent). In our investigations, we used model solutions of polylactide in tetraglycol (TG). Distilled water and water solutions of ethyl alcohol and / or glycerin were used as antisolvents.

The kinetics of TG diffusion from the polymer solution to water was studied by the method of laser refractometry. For all polymer solutions on refractive index time curve could be distinguished two regions: with unstable diffusion flow (I) and with stable diffusion flow (II) (Fig. 1).

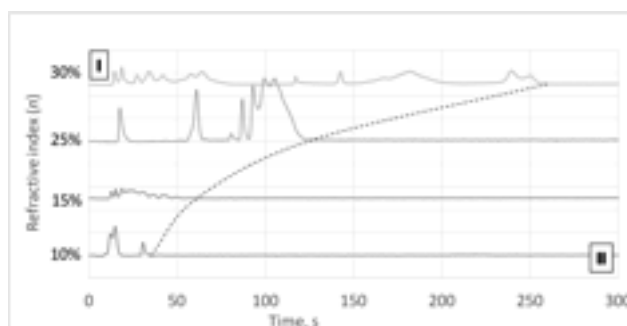


Fig.1. Time curve of the refractive index  $n$  of the system during TD diffusion from the polylactide solutions of various concentrations ( $M_w = 52\text{kDa}$ ) to water. I – stable diffusion area, II – unstable diffusion area.

The length of the unstable area increases with increasing polymer concentration in the solution. The absence of significant changes of the refractive index in linear area indicates the stabilization of diffusion flow rates, which is probably related to the end of the polymer membrane formation at the polymer / antisolvent interface.

Samples of polyester scaffolds, films and fibers were manufactured on an experimental 3D printer, which had

been developed at the Institute for Crystallography and Photonics of the Russian Academy of Sciences, to study micro- and macrostructures formed in the model system during of three-dimensional antisolvent printing (Fig. 2).

Film (Fig. 2b) and fiber (Fig.2.c) sections, as well as their surfaces, were studied with scanning electron microscopy method. The structures order noticeably changes when glycerol or ethyl alcohol solutions are used as antisolvent. Size features of the obtained structures directly depend on the polymer solution viscosity and the mass-transfer rate in the polymer-TG-antisolvent system in both films and fibers.

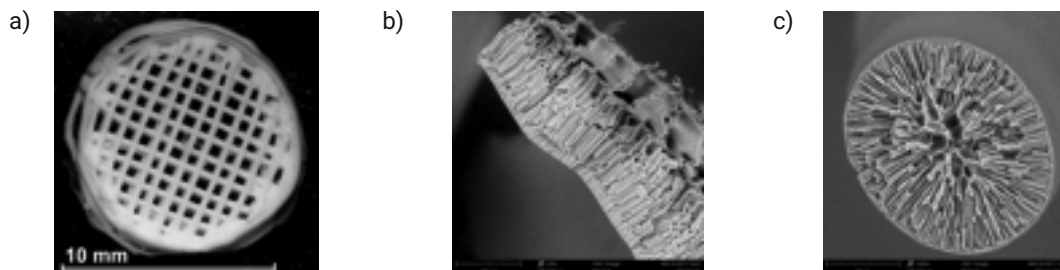


Fig. 2. Poly lactide scaffolds (a), film section (b) and fiber section (c).

Supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 16-29-11722 OFI\_m

#### References:

1. Mironov A.V., Grigoryev A.M., Krotova L.I., Skaletsky N.N., Popov V.K., Sevastianov V.I. 2017. 3D printing of PLGA scaffolds for tissue engineering // *J Biomed Mater Res Part A* 2017. Vol. 105A. №1. P. 104–109.

УДК: 616.982.27

## ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРНЫХ КУЛЬТУР В ТЕСТЕ МИКРОЦИТОТОКСИЧНОСТИ

Е.В.Пименова

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, Россия, 400131, Волгоград, Голубинская, 7, ekaterina-304@mail.ru, 89275208528

В работе обобщены результаты применения перевиваемых клеточных линий HeLa в качестве клеток-мишеней. Получены достоверные доказательства эффективности использования клеток эпителиоидной карциномы шейки матки человека в качестве индикаторных мишеней *in vitro* взамен общепринятому методу с использованием лабораторных животных.

**Ключевые слова:** мелиоидоз, антигены, цитотоксичность, перевиваемые клеточные линии, тест микроцитотоксичности

Одним из важных преимуществ применения клеточных линий заключается в возможности работать со стандартными культурами клеток с известными свойствами. Еще одно преимущество заключается в качественной и количественной оценке состояния клеток-мишеней за относительно короткий промежуток времени, а также в возможности осуществлять пролиферативную активность клеток.

Целью данного исследования было изучение цитотоксичности антигенных комплексов *B. pseudomallei* на модели перевиваемых клеточных культур человеческого происхождения.

В работе были использованы восемь образцов водно-солевых экстрактов (ВСЭ) из обеззараженных ацетоном микробных клеток возбудителя мелиоидоза, буркхольдерии II группы патогенности (*B. pseudomallei*, штаммы 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738). Во избежание контаминации растворов посторонней микрофлорой все применявшиеся в работе образцы антигенов возбудителя мелиоидоза были предварительно подвергнуты мембранной фильтрации (0,22 мкм) и приведены значения pH в диапазоне 7,0±0,1.

В качестве клеток-мишеней для изучения цитотоксичности антигенных комплексов были использованы паспортизированные перевиваемые клеточные линии человеческого происхождения HeLa S3 и HeLa TK – клетки эпителиоидной карциномы шейки матки человека, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночного института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Перевиваемые клеточные линии

культивировали в культуральных пластинах (Corning, США) в среде DMEM (Предприятие по производству бактериальных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова) с добавлением 2 mM глутамина, 4 mM пирувата натрия, пенициллин 100 ЕД/мл, стрептомицин 100 мкг/мл, HEPES 5 mM. Клетки культивировали в условиях абсолютной влажности в CO<sub>2</sub> –инкубаторе с 5% диоксидом углерода в атмосфере.

Индикаторные культуры высевали в 24-луночные планшеты по 1,0 •10<sup>5</sup> клеток в объеме 0,5 мл в каждую лунку. Через сутки после контроля во всех лунках вносили испытуемые образцы антигенов в дозировке 40 мкл одного из антигенов *B.pseudomallei*, что соответствовало по полисахаридной нагрузке 0,2 мг в каждой лунке. Сроки наблюдения за результатами эксперимента составлял 3 суток. Число жизнеспособных клеток подсчитывали в камере Горяева с помощью прижизненной окраской трипановым синим.

При анализе данных, полученных в этой серии опытов, установлено, что ВСЭ *B.pseudomallei* 100, 57576, 51274, 59361 обладали пролонгированным цитопатогенным эффектом по отношению к клеткам линии HeLa S3. Такие данные регистрировали в течение всего срока наблюдения за результатами контакта клеток-мишеней с антигеном. В то же время, ВСЭ *B.pseudomallei* 56770, 110, 60913, 56738 проявили различную степень цитопатогенности в отношении индикаторной культуры HeLa S3. Кривые цитопатогенности обеих линий клеток HeLa S3 и HeLa TK имеют сходную динамику по пролиферативной активности и чувствительности к воздействию антигенов возбудителя мелиоидоза.

#### Литература:

1. Еропкин, М.Ю. Культуры клеток как модельная система исследования токсичности и скрининга цитопротекторных препаратов / М.Ю. Еропкин, Е.М. Еропкина. – СПб. : МОРСАР АВ, 2003. – 239 с. 2. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р.Я. Фрешни. – пер. 5-го англ. изд. – М.: Бинном. Лаборатория знаний, 2011. – 691 с.

UDC 616.982.27

## THE USE OF CONTINUOUS CELL LINES OF HUMAN ORIGIN AS INDICATOR OF THE CULTURES IN THE TEST OF MICROCYTOTOXICITY

**E.Pimenova**

*Federal Government Health Institution «Volgograd Plague Control Research Institute», Volgograd, Russia, Russia, 400131, Volgograd, Golubinskaya, 7*

The paper summarizes the results of the use of continuous cell lines HeLa as target cells. Received credible evidence of the effectiveness of using cells epithelioid carcinoma of the cervix of a person as indicator target in vitro instead of the conventional method of using of laboratory animals.

**Key words:** melodos, antigens, cytotoxicity, continuous cell lines, test microcytotoxicity

One of the important advantages of using cell lines is the ability to work with standard cell cultures with known properties. Another advantage lies in the qualitative and quantitative assessment of target cells in a relatively short period of time, as well as the capacity to carry out the proliferative activity of cells.

The aim of this study was to investigate the cytotoxicity of antigenic complexes of *B. pseudomallei* on the model of transplantable cell cultures of human origin.

In this study we used eight samples of water-salt extracts of the purified acetone of microbial cells causative agent of melioidosis, burkholderia II pathogenicity groups (*B. pseudomallei* strains 57576, 56770, 51274, 59361, 110, 100, 60913, 56738). In order to avoid contamination of the solutions are extraneous microflora all used in the work samples of the antigens of the pathogen of melioidosis was previously subjected to membrane filtration (0.22 μm) and pH values in the range of 7,0±0,1.

As target cells to examine the cytotoxicity of antigenic complexes have been used passported transplantable cell lines of human origin HeLa S3 and HeLa TK – cells, epithelioid carcinoma of the cervix person obtained from the Russian cell culture collection of vertebrates, Institute of Cytology RAS (Saint-Petersburg). Transplantable cell lines were cultured in culture plates (Corning, USA) in DMEM medium (the Enterprise for manufacture of bacterial and viral preparations Institute of poliomyelitis and viral encephalitis them. M. P. Chumakov) supplemented with 2 mM glutamine, 4 mM sodium pyruvate, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μg/ml, HEPES 5 mM. Cells were cultured under conditions of absolute humidity in CO<sub>2</sub> incubator with 5% carbon dioxide in the atmosphere.

Indicator crops were sown in 24-hole tablets of 1.0 •10<sup>5</sup> cells in a volume of 0.5 ml in each well. A day after the control in all holes brought the samples of antigens in a dosage of 40 μl of one of the antigens of *B. pseudomallei*,

which corresponded to the polysaccharide at a load of 0.2 mg in each well. The follow-up of the results of the experiment was 3 days. The number of viable cells counted in the camera Goryaeva using intravital coloration of trypan blue.

In the analysis of the data obtained in this series of experiments, it was found that the LFI B. pseudomallei 100, 57576, 51274, 59361 had prolonged cytopathic effect against the cell line HeLa S3. These data were recorded during the whole period of observation results of contact of target cells with antigen. At the same time, the water-salt extracts B. pseudomallei 56770, 110, 60913, 56738 showed varying degrees of cytopathogenicity in relation to the indicator culture HeLa S3. Cytopathogenicity curves of both cell lines HeLa S3 and HeLa TK have similar dynamics of the proliferative activity and sensitivity to exposure to antigens of the causative agent of melioidosis.

*References:*

1. Eropkin, M. Yu. *Culture cells as model system for toxicity studies and screening of cytoprotective drugs* / M. Y. Eropkin, E. M. Eropkin. – SPb. : MORTAR AB, 2003. – 239 p 2. Fresne, R. I. *Culture of animal cells: a practical guide* / R. J. Fresno. – TRANS. of the 5th eng. ed. – M.: Binom. Laboratory of knowledge, 2011. – 691 p.

УДК 57.043, 579

## **ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛАЗЕРНОЙ ИНЖЕНЕРИИ МИКРОБНЫХ СИСТЕМ (ЛИМС) ДЛЯ АКТИВАЦИИ РОСТА РЕДКИХ И ТРУДНОКУЛЬТИВИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Чурбанова Е. С.<sup>1</sup>, Чепцов В.С.<sup>2</sup>, Жигарьков В.С.<sup>1</sup>, Юсупов В.И.<sup>1</sup>, Горленко М.В.<sup>2</sup>, Минаев Н.В.<sup>1</sup>, Чутко Е.А.<sup>1</sup>, Баграташвили В.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Институт Фотонных Технологий ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» РАН, 108840, Троицк, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет Почвоведения, 119991, Москва, Россия

e-mail: alnison@mail.ru

Описана технология лазерной инженерии микробных систем (ЛИМС), основанная на методе лазероиндуцированного переноса гетерогенных смесей, содержащих микроорганизмы (лазерной биопечати). Показано, что технология ЛИМС эффективна для выделения труднокультивируемых микроорганизмов.

**Ключевые слова:** Лазерная биопечать, гидрогель, почва, микроорганизмы

Технология лазерной инженерии микробных систем (ЛИМС) основана на методе лазероиндуцированного переноса вещества [1], позволяющем выделять пролиферирующие клетки микроорганизмов. Актуальность такой технологии обусловлена тем, что более 90% существующих в природе бактерий не поддаются культивированию стандартными способами. Расширение культивируемого биоразнообразия бактерий чрезвычайно важно для развития биотехнологий, в частности, для синтеза новых антибиотиков и биоактивных веществ. Один из подходов, позволяющих решить данную проблему и реализованных в ЛИМС, заключается в изолировании микроконсорциумов, содержащих единичные активные клетки микроорганизмов.

В технологии ЛИМС перенос микрокапли гелевого субстрата с носителями микроконсорциумов (рис. 1) происходит путем быстрого нагрева под действием наносекундного лазерного импульса до высоких температур тонкой поглощающей пленки, на которой находится слой субстрата. Эффективность ЛИМС зависит от многих параметров (лазерного импульса, поглощающей пленки, гелевого субстрата и др.) и определяется возможностью переноса нужного количества клеточно-гелевого субстрата с единичными носителями микроорганизмов без подавления функций жизнедеятельности живых систем [2].

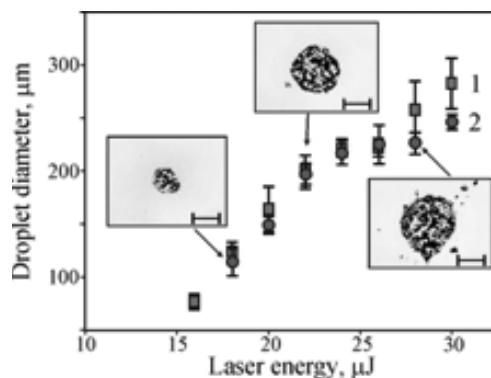


Рис. 1. Зависимость размера микрокапель геля (1) и субстрата - геля с частицами почвы (2) от энергии лазерного импульса. На вставках показаны изображения капель субстрата на акцепторной подложке. Размер отрезка 100 мкм.

В работе определены оптимальные параметры лазерного импульса, поглощающей пленки и гелевого субстрата, приводящие к воспроизводимым результатам и способствующие минимизации негативных воздействий на живые системы в процессе переноса.

Показано, что процесс переноса микрочастиц почвы на питательные среды с помощью технологии ЛИМС приводит к повышению культивируемого биоразнообразия бактерий, по сравнению с традиционными технологиями культивирования, что продемонстрировано на примере переноса микрочастиц почв и многолетнемерзлых арктических осадочных пород. В частности, выделен в чистую культуру штамм редкого рода актиномицетов *Nonomuraea*.

Эта работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 18-32-00607 (в разработке метода лазерной биопечати); Федеральное Агентство Научных Организаций, Соглашение № 007-GZ / С3363 / 26 (в разработке новой установки для технологий 3D-лазерной печати).

Литература:

1. Gruene M. et al. Dispensing pico to nanolitre of a natural hydrogel by laser-assisted bioprinting // *Biomedical engineering online*. – 2011. – Т. 10. – №. 1. – С. 19.
2. Юсупов В. И. и др. Лазерно-индуцированный перенос гелевых микрокапель для клеточной печати // *Квантовая электроника*. – 2017. – Т. 47. – №. 12. – С. 1158-1165.

UDC 57.043, 579

## APPLICATION OF THE TECHNOLOGY OF LASER ENGINEERING OF MICROBIAL SYSTEMS (LEMS) TO ACTIVATE THE GROWTH OF RARE AND HARD-CULTIVATED MICROORGANISMS

Churbanova E.S.<sup>1</sup>, Cheptsov V.S.<sup>2</sup>, Zhigarkov V.S.<sup>1</sup>, Yusupov V.I.<sup>1</sup>, Gorlenko M.V.<sup>2</sup>, Minaev N.V.<sup>1</sup>, Chutko E.A.<sup>1</sup>, Bagratashvili V.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Photonic Technologies, FRC "Crystallography and Photonics", RAS, Address: Pionerskaya Street, Moscow, Troitsk, 108840, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Department of Soil Science, Moscow, 119991, Russia  
 e-mail: alnison@mail.ru

The technology of laser engineering of microbial systems (LEMS) based on the method of laser-induced transport of heterogeneous mixtures containing microorganisms (laser bioprinting) is described. It is shown that LEMS technology is effective for isolating hard-cultivated microorganisms.

**Key words:** Laser bioprinting, hydrogel, soil, microorganisms

The technology of laser engineering of microbial systems (LEMS) is based on the method of laser-induced forward transfer (LIFT) of substance [1], which allows isolating proliferating cells of microorganisms. The relevance of this technology is due to the fact that more than 90% of bacteria existing in nature non-cultivated by standard methods. The expansion of cultivated biodiversity of bacteria is extremely important for the development of biotechnologies, in particular, for the synthesis of new antibiotics and bioactive substances. One approach that

allows to solve this problem and implemented in LEMS is to isolate micro-consortia containing single active cells of microorganisms.

In LEMS technology, the transfer of the microdroplet of the gel substrate with the medium of micro-consortia (fig. 1) occurs by rapid heating under the action of a nanosecond laser pulse up to high temperatures of a thin absorbing film on which the substrate layer is located. The effectiveness of LEMS depends on many parameters (laser pulse, absorbing film, gel substrate, etc.) and is determined by the possibility of transferring the required amount of cell-gel substrate with the single medium of microorganisms without suppressing vital functions of living systems [2].

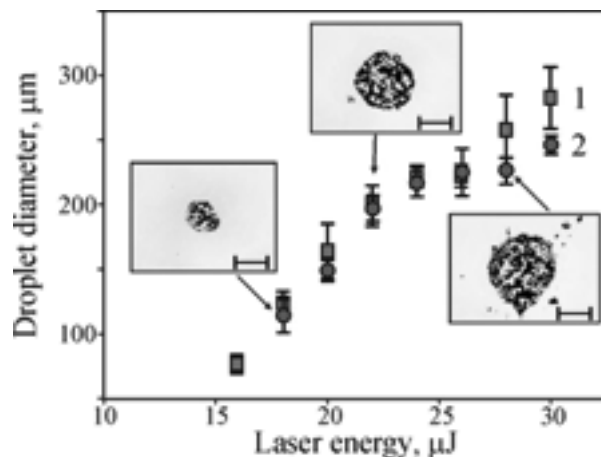


Fig. 1. Dependence of the size of gel (1) and substrate-gel with soil particles (2) microdroplets on the energy of the laser pulse. The insets show the images of substrate microdroplets on the acceptor plate. The size of the segment is 100 µm.

In this paper the optimal parameters of the laser pulse, absorbing film and gel substrate, leading to reproducible results and minimizing negative effects on living systems during the transfer process are determined.

It is shown that the process of soil microparticles transfer to nutrient media using LEMS technology leads to an increase in the cultivated biodiversity of bacteria, as compared to traditional cultivation technologies. This result is also confirmed by the transfer of a sensitive collection strain of *E. coli*. With the help of the LEMS method, the strain of a rare type of actinomycetes *Nonomuraea* was isolated into a pure culture.

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Grant No. 18-32-00607 (in the development of the laser bioprinting technique); the Federal Agency of Scientific Organizations, Agreement No. 007-GZ/C3363/26 (in the development of a new setup for 3D laser printing technologies).

References:

1. Gruene M. et al. Dispensing pico to nanolitre of a natural hydrogel by laser-assisted bioprinting // *Biomedical engineering online*. – 2011. – T. 10. – №. 1. – C. 19.
2. Yusupov V. I. et al. Laser-induced transfer of gel microdroplets for cell printing // *Quantum Electronics*. – 2017. – T. 47. – №. 12. – C. 1158.

# БИОФАРМА

## BIOPHARMACEUTICS

### ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ОБОРУДОВАНИЕ В БИОФАРМАЦЕВТИКЕ, РОССИЙСКО-ШВЕЙЦАРСКИЙ СИМПОЗИУМ

### RUSSIAN-SWISS SYMPOSIUM: NEW TECHNOLOGIES AND EQUIPMENT IN BIOPHARMACEUTICS

1. ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ В КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИН. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ, Красильников И. В., Фрадкин С.Б. ....	453
VIRUS-LIKE PARTICLES FOR CREATION OF VACCINES. PERSPECTIVE TECHNOLOGIES FOR THEIR PRODUCTION, Krasilnikov I.V., Fradkin S.B. ....	455
2. ИННОВАЦИОННЫЕ МИКРОФЛЮИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ОБОРУДОВАНИЕ В ФАРМАЦЕВТИКЕ И БИОМЕДИЦИНЕ, A.Herbst .....	456
INNOVATIVE MICROFLUIDICS TECHNOLOGIES AND EQUIPMENT IN PHARMACEUTICALS AND BIOMEDICAL, S, A. Herbst .....	457
3.ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ, КОТОРЫЕ УЛУЧШАЮТ КАЧЕСТВО, ВРЕМЯ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ В ОБЛАСТИ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ, Л. Багдасарян , Р. Бултуис, Е. Моленвик, С. Жуков .....	458
INNOVATION TECHNOLOGIES FOR PRE-CLINICAL RESEARCH THAT IMPROVE THE QUALITY , TIME AND EFFICIENCY OF PRE-CLINICAL EXPERIMENTS IN PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY STUDY, L.Bachdasarian, R.Bulthuis, E. Molenwijk, S. Zhuchkov .....	459
4. КРИОБАНК КАК ИНСТРУМЕНТ РАЗРАБОТКИ И ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ, Сазанов А.А., Ерганокв Х.Х., Pfeifer E. ....	459
CRYOBANK AS A TOOL FOR DEVELOPMENT AND TESTING OF MEDICAL AND DIAGNOSTIC ANTIBODIES, Sazanov A.A., Erganokov Kh.Kh., Pfeifer E. ....	460
5. МЕТОДЫ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ КЛЕТОК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В СОВРЕМЕННОЙ ИММУНОЛОГИИ, Урусов Д.Х. ....	461
FLOW CYTOMETRY METHODS WITH CELL VISUALIZATION FOR RESEARCH IN MODERN IMMUNOLOGY, Urusov D. ....	462
6. ПЛАТФОРМЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, Волкова И. М. ....	462
PLATFORM PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES, Volkova I. M. ....	463
7. ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОЛЯТОРОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОФАРМАЦЕВТИКЕ, Жером Ф., Гусева Е.В. ....	464
APPLICATION OF ISOLATORS IN BIOTECHNOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS, Jerome P., Guseva E.V.....	464
8. ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫЕ ФЕНОЛЫ – АНТИОКСИДАНТЫ КАК АДАПТОГЕНЫ К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ, Жигачева И.В., Голощапов А.Н. ....	465
SPATIAL HINDERED PHENOLS - ANTIOXIDANTS AS ADAPTOGENS TO STRESS IMPACT, Zhigacheva I.V., Goloshchapor A. N .....	466
9. РАЗРАБОКА МЕТОДА И ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛ МИРНК И ПЕПТИДНЫХ НОСИТЕЛЕЙ, Мурашко Н.В., Шиловский И.П., Тимофеева А.В., Андреев С.М., Смирнов В.В., Хаитов М.Р. ....	467
DEVELOPMENT OF THE METHOD AND THE STUDY OF PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF COMPOUNDS BASED ON siRNA MOLECULES AND PEPTIDE CARRIERS, Murashko N.V., Shilovskiy I.P., Timofeeva A.V., Andreev S.M., Smirnov V.V., Khaïtov M.R. ....	468

10. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ «МОЗГ-НА-ЧИПЕ» ДЛЯ СКРИНИНГА НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ, Христиченко А. Ю., Газарян И. Г., Полозников А. А. ....	469
DEVELOPMENT OF A "BRAIN-ON-A-CHIP" MODEL FOR SCREENING OF NEUROPROTECTIVE DRUGS, Khristichenko A. Yu., Ghazaryan I. G., Poloznikov A. A. ....	470
11. СЕЛЕКЦИЯ АКТИВНЫХ КОЛОНИЙ CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КЛОНИРОВАНИЯ, Смирнова Е.С., Слугина О.А., Соколова Ю.О., Зайцева Е.С. ....	471
SELECTION OF ACTIVE COLONIES OF CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM USING METHOD OF CLONING, Smirnova E.S., Slugina O.A., Sokolova J.O., Zaytseva E.S. ....	472
12. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДСОРБЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ НА РАЗЛИЧНЫХ СОРБЕНТАХ, Красовицкая И. А., Котова Н.В., Глазова Н.В. ....	473
COMPARATIVE ANALYSIS OF ADSORPTION IMMOBILIZATION OF $\alpha$ - AMYLASE ON VARIOUS SORBENTS, Krasovitskaya I. A., Kotova N. V., Glazova N. V. ....	474
13. ТЕСТИРОВАНИЕ МОДУЛЕЙ НОВЫХ МОДУЛЬНЫХ НАНОТРАНСПОРТЕРОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ФРАГМЕНТА ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ NRF2 В КЛЕТКИ-МИШЕНИ, Д.И.Зрелкин, А.А.Розенкранц, А.В.Уласов, Т.А.Сластникова, Т.Н.Лупанова, А.С.Соболев ....	475
FUNCTIONALITY OF THE MODULES OF NEW MODULAR NANOTRANSPORTERS FOR DELIVERY OF FRAGMENT OF TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 INTO TARGET CELLS, D.Zrelkin, A.Rosenkranz, A.Ulasov, T.Slastnikova, T.Lupanova, A.Sobolev ....	476
14. ТЕХНОЛОГИЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БИОАНАЛИТОВ НА ПРИМЕРЕ IL-13 ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ, Прохорова М.В. ....	477
ULTRA LOW BIOMARKER DETECTION EXEMPLIFIED BY IL-13 IN AUTOIMMUNE DESEASES, M. Prokhorova ....	477
15. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ОМАЛИЗУМАБ И ЭКУЛИЗУМАБ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОНЦЕПЦИИ «MULTI ATTRIBUTE METHOD», Дегтерев М.Б. ....	478
THE ANALYSIS OF OMALIZUMAB AND ECLIZUMAB MONOCLONAL ANTIBODIES WITH THE MULTI ATTRIBUTE METHOD (MAM) LIQUID CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY, M. Degterev ....	480
16. ЦИФРОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ, Меньшутина Н.В., Матасов А.В. ....	482
DIGITAL TECHNOLOGIES IN PHARMACEUTICAL ENTERPRISES, Menshutina N.V., Matasov A.V. ....	483

УДК 577.6.083.3.88

## ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ В КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИН. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

Красильников И. В. <sup>1</sup>, Фрадкин С.Б. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГУП «СПБНИИВС ФМБА России», г. Санкт-Петербург, Россия  
198320, г. Санкт-Петербург, Красное Село, ул. Свободы, д. 52

<sup>2</sup> 198320. ООО «Рорер» Процессное и упаковочное оборудование, 121471 Москва, Ул. Рябиновая, д. 26, стр. 2,  
офис 608

Email: i.v.krasilnikov@spbniivs.ru

Вакцины оказались наиболее эффективным инструментом для борьбы с инфекциями. Показана дальнейшая возможность повышения их эффективности в случае применения инновационных платформ для получения антигенов в виде вирусоподобных частиц, а также при использовании в вакцинах новых адъювантов и способов введения.

**Ключевые слова:** антигены вирусов и бактерий, вакцины, вирусоподобные частицы, иммунный ответ, адъюванты, орально диспергируемые таблетки.

Одним из наиболее экономически эффективных лекарственных средств, которые на протяжении истории человечества спасли жизни сотням миллионов людей, являются вакцины.

Иммунизация способствовала ликвидации оспы, сократила в 3 раза детскую смертность от кори, привела, практически, к ликвидации полиомиелита в Северной Америке и Европе. Недаром вакцинация признана од-



ним из основных достижений 20-го века.

Однако до сих пор детскими вакцинами не обеспечен каждый пятый ребенок на планете, отчего ежегодно от инфекционных заболеваний погибает около 1,5 млн. детей.

Более того, все чаще при изучении соматических заболеваний ученые находят возбудителей инфекций, причастных к болезни.

К настоящему времени созданы эффективные вакцины против десятков бактериальных и вирусных возбудителей. Однако при массовых вакцинациях населения производители столкнулись с определенными проблемами: для некоторых вирусов не было найдено систем культивирования, пригодных для производства (вирусы гепатита В и С); имеющиеся субстраты, в которых вирус размножается, не позволяют производить достаточное количество антигенов для производства вакцин;

иммуногенность современных вакцин не достаточна для эффективной профилактики ряда болезней.

Вторая и третья проблемы особенно актуальны для вируса гриппа, пандемия которого представляет реальную угрозу для здравоохранения.

Решить эти основные проблемы производства вакцин способны методы генной инженерии и клеточной энзимологии, с помощью которых создаются рекомбинантные вакцины.

К одной из первых рекомбинантных вакцин относится живая аттенуированная гриппозная вакцина, полученная реассортацией. Вирус гриппа имеет фрагментированный геном, и при размножении в клетке различных штаммов вируса возможен обмен фрагментами их генома.

Кроме того, вирус гриппа служит «платформой» для создания рекомбинантных вакцин за счет получения штамма с делецией фрагмента, кодирующего NS3.

Были получены рекомбинантные штаммы вируса гриппа, содержащие дополнительные гены гемагглютина или вирулентных туберкулезных антигенов.

Важным этапом в развитии вакцинных технологий явились исследования по созданию вакцин в виде вирусоподобных частиц (ВПЧ). К настоящему времени создано несколько платформ, позволяющих получать вакцины в виде ВПЧ: на основе лентивирусов, вирусов насекомых и растений, а также дрожжей. Эти платформы послужили созданию опытных вакцин против гриппа, туберкулеза, респираторного вируса.

Технология инфекционного клонирования была использована для создания ряда аттенуированных вакцин, в том числе для вакцины лихорадки Денге. Были получены бивалентные штаммы вируса, на основе которых производится универсальная вакцина, формирующая иммунный ответ к четырем его серотипам.

В настоящее время ведутся исследования на основе описанной платформы по созданию комбинированной вакцины против желтой лихорадки и лихорадки Денге.

В качестве вектора используется вирус желтой лихорадки, геном которого содержит гены, кодирующие поверхностные детерминанты всех четырех типов вируса Денге.

Значительной победой генной инженерии в области создания эффективных вакцин стала вакцина против гепатита В. Ген поверхностного белка этого вируса (HBsAg) в составе плазмиды удалось интегрировать в клетки дрожжей. Был получен штамм-продуцент, способный синтезировать гликозилированный поверхностный антиген. Этот рекомбинантный белок является основой эффективной вакцины против гепатита В, которая уже 20 лет широко применяется во всем мире.

В настоящее время ведутся исследования по созданию терапевтической вакцины гепатита В. Создан рекомбинантный белок, содержащий детерминанты внутреннего и поверхностного антигенов вируса гепатита В. Такая вакцина способна подавлять синтез вируса гепатита В в клетках человека.

Развитие терапевтических вакцин зависит от успехов в области ДНК-вакцин, способных формировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ.

В настоящее время ряд американских компаний приступил к производству терапевтических вакцин против меланомы, колоректального рака, лейкозов и других опухолей.

Ведутся работы по созданию вакцин против ревматоидного артрита, рассеянного склероза, миастении, аллергических заболеваний.

Для повышения иммуногенности современных вакцин исследователи все чаще применяют адъюванты, способные активировать клеточный или гуморальный иммунный ответ. Важно, чтобы введение адъювантов в вакцины не приводило к повышению реактогенности или аллергенности конечного препарата.

К настоящему времени разработан ряд адъювантов, способных регулировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ, которые получили разрешение или находятся в процессе получения разрешения на применение в составе вакцин.

При создании вакцин следует также учитывать форму их применения. Существует прогресс в разработке интраназальных форм, а также орально диспергируемых форм для сублингвального применения.

УДК 577.6.083.3.88

## VIRUS-LIKE PARTICLES FOR CREATION OF VACCINES. PERSPECTIVE TECHNOLOGIES FOR THEIR PRODUCTION

Krasilnikov I.V. <sup>1</sup>, Fradkin S.B. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg Institute of Vaccines&Sera FMBA Russia, Saint Petersburg, Russia  
198320, Saint Petersburg, Krasnoe Selo, Svoboda str., 52  
Email: i.v.krasilnikov@spbniiivs.ru

<sup>2</sup> LLC Rohrer Tool, Processing & Packaging Technology, Moscow, Russia.  
121471, Moscow, Ryabinovaya Str., 26, build. 2, office 608

Vaccines proved to be the most effective tool for fighting infections. It is shown a further possibility of increasing their effectiveness in the case of using innovative platforms for obtaining antigens as virus-like particles, as well as when using new adjuvants and delivery methods for vaccines.

**Key words:** antigens of viruses and bacteria, vaccines, virus-like particles, immune response, adjuvants, orally dispersible tablets.

One of the most cost-effective medicines that throughout the human history have saved the lives of millions of people are vaccines.

Immunization contributed to the eradication of smallpox, reduced the child mortality from measles 3 times and in fact led to the eradication of poliomyelitis in North America and Europe. Not without reason, vaccination is recognized as one of the main achievements of the 20th century.

However, up to now, every fifth child on the planet is not provided with child vaccines, which causes 1.5 million children per year from infectious diseases

Moreover, more often in the study of somatic diseases, scientists find the causative agents of infections involved in the disease.

To date, effective vaccines have been developed against dozens of bacterial and viral pathogens. However, with mass vaccinations of the population, manufacturers faced certain problems:

for some viruses, cultivation systems suitable for production (hepatitis B and C viruses) have not been found; the substrates in which the virus multiplies do not allow the production of sufficient antigens for vaccine production;

the immunogenicity of modern vaccines is not sufficient for the effective prevention of a number of diseases.

The second and third problems are especially relevant for the influenza virus, the pandemic of which poses a real threat to public health.

Solving these major problems in the production of vaccines are capable of genetic engineering and cellular enzymology, through which recombinant vaccines are created.

One of the first recombinant vaccines is a live attenuated influenza vaccine, obtained by reassortment. The influenza virus has a fragmented genome, and when a variety of strains of the virus multiply in a cell, fragments of their gene can be exchanged.

In addition, the influenza virus serves as a "platform" for creating recombinant vaccines by obtaining a strain with the deletion of a fragment encoding NS3.

Recombinant influenza virus strains containing additional hemagglutinin genes or virulent tuberculosis antigens were obtained.

An important stage in the development of vaccine technologies was research on the creation of vaccines in the form of virus-like particles (VLP). To date, several platforms have been created that make it possible to obtain vaccines in the form of VLP: based on lentiviruses, insect and plant viruses, and on yeast. These platforms served as the foundation for the development of vaccines against influenza, tuberculosis, respiratory virus.

The technology of infectious cloning was used to create a number of attenuated vaccines, including for the Dengue fever vaccine. Bivalent strains of the virus were obtained, on the basis of which a universal vaccine is formed, forming an immune response to their four serotypes.

Currently, studies are being conducted on the basis of the described platform for the creation of a combined vaccine against yellow fever and Dengue fever.

As a vector, the yellow fever virus is used, the genome of which contains genes that code the surface determinants of all four types of the Dengue virus.

One of the first recombinant vaccines is the live attenuated influenza vaccine produced by reassortment. The

influenza virus has a fragmented genome, and during the replication of different virus strains within the cell, gene fragments of the virus's key surface proteins, hemagglutinin and neuraminidase, may be exchanged.

The infectious clone technology has been used to create a number of attenuated vaccines including the anti-dengue vaccine. Bivalent virus strains have been obtained which are used to produce a universal vaccine inducing an immune response against all four serotypes of dengue virus.

This provided a platform for ongoing research aiming to create a combined yellow fever and dengue vaccine.

The yellow fever virus, whose genome contains genes encoding surface epitopes of all four types of dengue virus, is used as the vector.

A significant success of genetic engineering in the development of effective vaccines was the creation of a vaccine against hepatitis B. The surface protein gene of this virus (HBsAg) was integrated into yeast cells as part of the plasmid. A producer strain able to synthesize a glycosylated surface antigen was obtained. This recombinant protein became the basis for an effective hepatitis B vaccine, which has been widely used throughout the world for the last two decades.

Currently, research is underway to develop a therapeutic hepatitis B vaccine. A recombinant protein has been created containing the epitopes of the hepatitis B core and surface antigen. Such vaccine is able to inhibit the synthesis of hepatitis B virus in human cells.

The development of therapeutic vaccines depends on the progress in the field of DNA vaccines capable of inducing both cell- and antibody-mediated immune responses.

To date, a number of US companies have started production of therapeutic vaccines against melanoma, colorectal cancer, leukemia, and other types of tumors.

Work is also underway to create vaccines against rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, myasthenia gravis, and allergies.

To enhance the immunological potency of modern vaccines, researchers increasingly use adjuvants activating either the cell-mediated or antibody-mediated immune response. It is important that the addition of such adjuvants to vaccines do not increase the reactogenicity or allergenic potency of the final formulation. To date, there is a number of newly developed adjuvants that are already approved or in the process of being approved for use in vaccines.

УДК 239.615

## ИННОВАЦИОННЫЕ МИКРОФЛЮИДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И ОБОРУДОВАНИЕ В ФАРМАЦЕВТИКЕ И БИОМЕДИЦИНЕ

**А.Гербст**

директор Wingflow AG Кристоф Мериан-Ринг 23, CH-4153 Райнах / Швейцария  
e-mail: herbst@wingflow.ch

Одним из инновационных направлений в области биотехнологий и фармацевтики, химии является микрофлюидная технология, основанная на миниатюрных устройствах - непрерывных проточных реакторах (микрочипах) и автоматизированных безпульсационных системах дозирования техники, обеспечивающий контроль за поведением жидкости и точным управлением потоками в режиме онлайн.

**Ключевые слова:** микрофлюидика, непрерывные проточные реактора, микрочипы, биомоделирование in vitro функциональных элементов органов и тканей, платформа Органы-на-Чипе (Organ-on-Chip), свободно циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК).

Одним из инновационных направлений в области биотехнологий и фармацевтики, химии является микрофлюидная технология, основанная на миниатюрных устройствах - непрерывных проточных реакторах (микрочипах) и автоматизированных безпульсационных системах дозирования техники, обеспечивающий контроль за поведением жидкости и точным управлением потоками в режиме онлайн.

В связи с качественным скачком автоматизированной техники дозирования, развитие технологии непрерывных реакций в последние десятилетия получило мощный импульс: микрофлюидика стала широко применяться в биотехнологических, химических и фармацевтических компаниях в Западной Европе и США как в научных лабораториях, так и в производственном масштабе.

Прецизионное управление потоком в микрочипе дает неоспоримые преимущества в биотехнологических областях и медицине. Это новые подходы и возможности по культивированию и прецизионному анализу клеток, управление пространственным расположением популяций клеток и их микроокружением,

биомоделирования *in vitro* функциональных элементов органов и тканей, мониторинг в реальном времени за динамической природой протекающих в них физиологических и патологических процессов, проведение исследований клеточных культур в сверхкритических условиях (например, невесомости), изучение цитотоксичности, а также механизмов сигнализации между клетками и электрофизиологических изменений, инкапсулирование одной и несколько клеток (тканевой инженерия и генетический анализ единичной клетки), с снижением риска контаминации, меньший расход реагентов, гибкостью микрофлюидных систем, в целом существенно сокращая затраты на исследование, внедрение.

Платформа Органы-на-Чипе (Organ-on-Chip) имеет огромный потенциал, чтобы привести к изменению парадигмы в множестве областей исследований, включая разработки лекарственных средств, токсикологический скрининг, персонализированную медицину, а также моделирование заболевания.

Кроме того, Органы-на-Чипе имеют огромный потенциал в области персонализированной медицины и по конкретным заболеваниям. Технология стволовых клеток открывает большие возможности в создании индивидуального чипа пациента. Таким образом можно изучить, как пациент будет реагировать на одобренный препарат.

Wingflow AG является разработчиком и производителем уникального микрофлюидного оборудования как лабораторного, так и производственного масштаба, предлагая услуги по внедрению технологии в России с учётом наработок западно-европейских партнёров. Компания работает в партнёрстве с Fraunhofer IGB Stuttgart (Германия), Fraunhofer IMM Mainz (Германия), microfluidic ChipShop (Германия), University of Twente (Голландия), ETH Zurich (Швейцария).

Стартовые микрофлюидные наборы производства Wingflow AG позволяют успешно внедрять данную прогрессивную технологию в процесс обучения в ВУЗах, средних и средне-специальных заведениях с биотехнологическим уклоном. Это позволит максимально использовать неоспоримые преимущества технологии в интересах дальнейшего динамичного роста экономики России.

UDC 239.615

## INNOVATIVE MICROFLUIDICS TECHNOLOGIES AND EQUIPMENT IN PHARMACEUTICALS AND BIOMEDICALS

### A. Herbst

CEO Wingflow AG (Switzerland). Christoph Merian-Ring 23, CH-4153 Reinach / Switzerland  
e-mail: [herbst@wingflow.ch](mailto:herbst@wingflow.ch)

One of the innovative directions in the field of biotechnology, pharmaceuticals and chemistry is the microfluidic technology based on miniaturized devices - continuous flow reactors (microchips) and automated non-pulsating dosing systems, providing control over fluid behavior and accurate flow control on-line.

**Key words:** microfluidics, continuous flow reactors, microchips, *in vitro* biomodeling of functional elements of organs and tissues, organ-on-chip platform, liquid biopsy, free circulated tumor cells.

One of the innovative directions in the field of biotechnology, pharmaceuticals and chemistry is the microfluidic technology based on miniaturized devices - continuous flow reactors (microchips) and automated non-pulsating dosing systems, providing control over fluid behavior and accurate flow control on-line.

Due to the qualitative leap of automated dosing technology, the development of continuous reaction technology has received a powerful impetus in recent decades: microfluidics have become widely used in biotechnology, chemical and pharmaceutical companies in Western Europe and the United States both in scientific laboratories and on a production scale.

Precision flow control in the microchip gives undeniable advantages in biotechnology and medicine. These are new approaches and opportunities for cultivating and precise cell analysis, managing the spatial distribution of cell populations and their microenvironment, *in vitro* biomodeling of functional elements of organs and tissues, real-time monitoring of the dynamic nature of the physiological and pathological processes taking place in them, conducting cell culture studies in supercritical conditions (eg, weightlessness), the study of cytotoxicity, as well as signaling mechanisms between cells and electrophysiological changes, encapsulation of one or several cells (tissue engineering and genetic analysis of single cells), with the reduction in the risk of contamination, lower reagent consumption, flexibility of microfluidic systems, in general, significantly reducing the cost of research, implementation.

The Organ-on-Chip platform has enormous potential to lead to a paradigm shift in a variety of research areas,

including drug development, toxicology screening, personalized medicine, and disease modeling.

Liquid biopsy is a new direction in the diagnosis of oncological diseases and monitoring of the therapy used and is based on the analysis of a blood sample with a volume of 7.5 ml and the isolation of free Circulating Tumor Cells - CTC. Wingflow AG (Switzerland), together with Fraunhofer IMM Mainz (Germany), offers a unique development - a compact robotic microfluidic system "CTCelect", which has no analogues in the world, the main advantage of which is automatic enrichment, counting and isolation of cells for further research.

Wingflow AG is a developer and manufacturer of unique microfluidic equipment, both laboratory and production scale, offering services for the introduction of technology in Russia, taking into account the developments of Western European partners. The company works in partnership with Fraunhofer IMM Mainz (Germany), Fraunhofer IGB Stuttgart (Germany), microfluidic ChipShop (Germany), Uniklinik Jena (Germany), University of Twente (Holland), ETH Zurich (Switzerland).

Starting microfluidic sets produced by Wingflow AG allow the successful implementation of this progressive technology in the process of training in universities, medium and special institutions with a biotechnological bias. This will make maximum use of the undeniable advantages of technology in the interests of further dynamic growth of the Russian economy.

## ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ, КОТОРЫЕ УЛУЧШАЮТ КАЧЕСТВО, ВРЕМЯ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ В ОБЛАСТИ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ

Л. Багдасарян <sup>1</sup>, Р. Бултуис <sup>1</sup>, Е. Моленвик <sup>1</sup>, С. Жуков <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Metris B.V., The Netherlands, 2132 NG Hoofddorp, Kruisweg 829c, www.metris.nl

<sup>2</sup> University of Orel, Russia, www.univ-orel.ru

Современные тенденции в фармацевтической промышленности требуют не только короткие сроки, но и лучшего качества результатов от доклинических испытаний. Для достижения этой цели в экспериментах на животных, необходимо собирать данные из различных областей одновременно, например параметры от поведение животных, физиологии животных и животных вокализации. Чтобы сделать это практически возможно автоматизации и интеграции различных технологий измерения становится важным в доклинических исследованиях.

**Ключевые слова:** стандартные виварии, лаборатории, вибрация, ультразвуковая вокализация, сон, физиология

Поведение животных является интерпретация внутренних и внешних факторов (стимулов).

До клинические исследование = Функция { внутренние стимулы / внешние стимулы}

Поведение = Функция {динамического внутреннего стимула / эффекты лекарство}; если внешние факторы/стимулы = константа

Постоянная окружающая среда: стандартные виварии и лаборатории, индивидуально вентилируемые стеллажи и клетки для GLP стандарт содержания животных, постоянные внешние факторы (температура, влажность, воздухообмен, запах, нет вибрации)

LABPRODUCTS - обеспечивает лабораторные продукции (клетки, индивидуальные вентилируемые стеллажи, верстаки, рабочие поверхность, моющие машины и много другие лабораторные (vivarium) принадлежности)

- Постоянная и стабильная окружающая среда необходима для проведения надежных и достоверных поведенческих исследований.

- Для повышения качества исследований и получения лучшей статистики, важно анализировать многие параметры из того же исследование. Благодаря сочетанию параметров из различных систем матрица будет становиться лучше и это будет улучшать качества результатов от исследований.

LABORAS - система для полного автоматического распознавания, регистрации и анализа поведения маленьких лабораторных грызунов(крыс, мышей), основан на анализа вибрации и энергии.

SONOTRACK- система для записи, воспроизведения и визуализации ультразвуковых вокализаций лабораторных животных.

DSI - система для измерения физиологических параметров дистанционно ( без проводная измерения

давления, температура, ECG, EEG, EMG, идентификация, активность, дыхание)

SLEEPSIGN /Kissei- программное обеспечение SLEEPSIGN для автоматического обнаружения и глубокого анализа стадий сна у животных на основании EEG, EMG сигналов.

## INNOVATION TECHNOLOGIES FOR PRE-CLINICAL RESEARCH THAT IMPROVE THE QUALITY , TIME AND EFFICIENCY OF PRE-CLINICAL EXPERIMENTS IN PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY STUDY

Dr.L.Bachdasarian <sup>1</sup>, R.Bulthuis <sup>1</sup>, E. Molenwijk <sup>1</sup>, S. Zhuchkov <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Metris B.V. , The Netherlands, 2132 NG Hoofddorp, Kruisweg 829c, www.metris.nl

<sup>2</sup> University of Orel, Russia, www.univ-orel.ru

Current trends in the Pharmaceutical industry are requiring not only shorter lead times but also better quality of pre-clinical test results. To achieve this animal experiments will have to collect data from different domains at the same time, for example animal behavior, animal physiology and animal ultrasounds vocalizations. To make this practically possibly automation and integration of different measurement technologies becomes crucial in preclinical research.

**Key words:** stabile vivarium, vibration, ultrasounds vocalizations, physiology, sleep stages

Pre-Clinical study = function {internal stimuli / external stimuli}

Behavior = function {dynamic internal stimulus /from drug effects}; if external factors = constant

Constant environment, stabile vivarium and laboratory individually ventilated racks and cages for animals, GLP standard, constant environmental factors (temperature, humidity, ventilation/airflow, odor, no vibration)

LABPRODUCTS - provides laboratory products (cages, individual ventilated racks, work benches, change stations, washing machine and many other laboratory (vivarium) Accessories)

- A constant environment is essential to build reliable behavioral and physiological study and analysis

- To enhance the quality of the study and have better statistical probability, It is important to analyze many parameters from the same study simultaneously.

By combining parameters from different systems the matrix will get better and further improve the quality of the research results.

LABORAS - system for fully automatic recognition, recording and analysis of the behavior of small laboratory rodents (rats, mice), based on the analysis of vibration and energy.

SONOTRACK-system for recording, playback and visualization of ultrasounds vocalizations in laboratory animals. Automatic classification of USV calls from mice!

DSI - system for measuring physiological parameters remotely (without wire measuring pressure, temperature, ECG, EEG, EMG, identification, activity, respiration)

SLEEPSIGN / Kissei-SLEEPSIGN software for automatic detection and deep analysis of sleep stages in the animals on the basis of EEG, EMG signals.

УДК 573.6.086.83

## КРИБАНК КАК ИНСТРУМЕНТ РАЗРАБОТКИ И ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

Сазанов А.А. <sup>1</sup>, Ерганокв Х.Х. <sup>2</sup>, Pfeifer E. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Россия, 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., д. 26

e.mail: alexei.sazanov@technolog.edu.ru

<sup>2</sup> ООО Криотек, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 38

e.mail: kh.erganokov@cryotec.ru

<sup>3</sup> ASKION GmbH, Gewerbepark Keplerstraße 17-19, 07549, Gera, Германия

e.mail: info@askion.com

Обоснована целесообразность использования технологии обработки, замораживания и хранения образцов в контролируемой влажностной и температурной среде для тестирования кросс-реактивности тера-

пептических и диагностических антител.

**Ключевые слова:** биобанки; криобанки; тканевые панели; кросс-реактивность; аннотирование; контроль условий хранения

Биологические коллекции подробно и качественно аннотированных образцов тканей человека и лабораторных животных в норме и патологии с высокой сохранностью биологических молекул и клеточной структуры имеют большое значение для исследований в области разработки и тестирования лекарственных средств. Согласно международным рекомендациям исследование тканевой кросс-реактивности (tissue cross-reactivity - TCR) является существенным требованием при разработке лекарственных средств на основе моноклональных антител. Такие исследования проводят иммуногистохимическими методами на больших панелях нормальных тканей человека и лабораторных животных с использованием терапевтического антитела в качестве первичного реагента.

Требования регуляторов включают следующие положения: (1) для моноклональных антител должно быть получено детальное описание иммунологических особенностей, включая антиген-специфичность, комплементарное связывание, любые случаи непредусмотренной реактивности или цитотоксичности в тканях, отличных от целевой; (2) исследования кросс-реактивности должны быть проведены соответствующими иммуногистохимическими методами на больших панелях нормальных тканей человека.

Проведенное в 2010-м году исследование по использованию TCR для разработки лекарственных средств на основе моноклональных антител семнадцатью ведущими фармацевтическими компаниями мира (приведены данные по 118-ти биологическим молекулам), свидетельствует о том, что в 38% этот метод использовали для подтверждения результатов тестирования токсичности на животных, в 37% - для определения тканевой специфичности связывания биомолекул, в 6% - для выбора вида животных для тестирования токсичности.

Таким образом, регуляторные документы и опыт ведущих компаний – производителей терапевтических антител свидетельствуют об актуальности и существенной значимости исследований тканевой кросс-реактивности.

Для качественного тестирования кросс-реактивности тканевые макро- (число ячеек меньше 100) или микропипы (число ячеек больше 100) должны быть составлены в двух вариантах: (1) замороженные блоки (имеют преимущество для использования иммуногистохимических методов ввиду большей сохранности белковых молекул) и (2) парафиновые блоки – FFPE (имеют преимущество для использования классических гистологических методов ввиду большей морфологической сохранности).

Следует подчеркнуть, что для лучшей сохранности эпитопов необходимо хранение при криогенных температурах. В наибольшей степени этим требованиям удовлетворяет режим хранения в газовой фазе жидкого азота при температуре ниже -150°C, который может быть обеспечен при использовании нового класса роботизированных герметичных криохранилищ ASKION HS200S и герметичного криогенного модуля WorkBench для подготовки образцов и их программной заморозки.

UDC 573.6.086.83

## CRYOBANK AS A TOOL FOR DEVELOPMENT AND TESTING OF MEDICAL AND DIAGNOSTIC ANTIBODIES

Sazanov A.A. <sup>1</sup>, Erganokov Kh.Kh. <sup>2</sup>, Pfeifer E. <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University)  
Moskovsky prospect 26, Saint-Petersburg, 190013, Russia  
e.mail: alexei.sazanov@technolog.edu.ru

<sup>2</sup> Cryotec LLC, Vavilova street 38, Moscow, 119991, Russia  
e.mail: kh.erganokov@cryotec.ru

<sup>3</sup> ASKION GmbH, Gewerbepark Keplerstraße 17-19, 07549, Gera, Germany  
e.mail: info@askion.com

The expediency of using the technology of processing, freezing and storage of biosamples in a controlled humidity and temperature environment for testing cross-reactivity of therapeutic and diagnostic antibodies was substantiated.

**Key words:** biobanks; cryobanks; tissue panels; cross-reactivity; annotation; monitoring of storage conditions

Biological collections of in detail and good-quality annotated samples of human and laboratory animal tissues in norm and pathology with high safety of biological molecules and cellular structure are of great importance for research in the development and testing of drugs. According to international recommendations, the investigation of tissue cross-reactivity (TCR) is an essential requirement for the development of drugs based on monoclonal antibodies. Such studies are performed by immunohistochemical methods on large panels of normal human and laboratory animal tissues using a therapeutic antibody as the primary reagent.

The regulatory requirements include the following: (1) a detailed description of the immunological features, including antigen specificity, complementary binding, any cases of unintended reactivity or cytotoxicity in tissues other than the target, should be obtained for monoclonal antibodies; (2) cross-reactivity studies should be conducted by appropriate immunohistochemical methods on large panels of normal human tissues.

A study performed in 2010 of the cases of using TCR for the development of drugs based on monoclonal antibodies by seventeen leading pharmaceutical companies in the world (data on 118 biological molecules) shows that in 38% this method was used to confirm the results of toxicity testing in animals, in 37% - for determining the tissue specificity of biomolecules binding, in 6% - for selecting the species of animals for toxicity testing.

Thus, regulatory documents and experience of the leading companies - manufacturers of therapeutic antibodies testify to the relevance and essential significance of studies of tissue cross-reactivity.

For good-quality testing of cross-reactivity, tissue macro- (number of cores less than 100) or microchips (number of cores greater than 100) should be made in two versions: (1) frozen blocks (have the advantage of using immunohistochemical methods due to greater safety of protein molecules) and (2) paraffin blocks - FFPE (have the advantage of using classical histological methods due to greater morphological safety).

It should be emphasized that for better preservation of epitopes, storage at cryogenic temperatures is required. To the greatest extent these requirements are met by the long term storage of biological samples in the vapor phase of liquid nitrogen at a temperature below -150 °C, which can be achieved by using a new class of robotic hermetic cryogenic storage ASKION HS200S and a hermetic cryogenic module WorkBench for sample preparation and controlled rate freezing.

УДК 576.5

## МЕТОДЫ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ВИЗУАЛИЗАЦИЕЙ КЛЕТОК ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В СОВРЕМЕННОЙ ИММУНОЛОГИИ.

Урусов Д.Х

ООО «Мерк», 115054, Москва, Россия. Бизнес центр Wall Street, ул. Валовая д. 35, этаж 6, +7(495)937-33-04  
damir.urusov@merckgroup.com

Данный анализ демонстрирует потенциал для мониторинга результата действия различных сигнальных путей одновременно, используя технологию проточной цитометрии изображений клеток ImageStream X Mk II.

**Ключевые слова:** Проточная цитометрия с визуализацией, апоптоз, ядерная транслокация.

Клеточные изображения предоставляют множество информации, которая может быть быстро интерпретирована наблюдателем. Однако объективно и статистически строгая интерпретация требует количественного анализа большого количества изображений. Технология ImageStream X Mk II позволяет осуществлять мультиспектральный флуоресцентный анализ большого количества изображений клеток в потоке, с использованием аналитических алгоритмов, обеспечивающих надежную количественную детекцию на основе изображений клеток. Метод проточной цитометрии изображений клеток позволяет проводить в короткие сроки анализ тысяч и десятков тысяч клеток и клеточных компонентов по более чем 2000 морфологическим и флуоресцентным параметрам с помощью стандартных и создаваемых самим исследователем алгоритмов анализа.

В этом исследовании мы объединили использования, основанные на морфологии функции для мониторинга стауроспорин-индуцированной транслокации NF-κB и гибели клеток в одном анализе. Стауроспорин индуцировал два типа морфологических различных форм смерти клеток: 1) апоптоз как функцию повышенной интенсивности активированной каспазы-3, указывая на эффекторную активацию каспаз; и 2) некроз, измеряемый по изменению градиента контраста изображений ядер. Стауроспорин также индуцировал значительную ядерную транслокацию NF-κB, измеряемую по алгоритму подобию, который оценивает корреляцию между ядерными изображениями NF-κB и 7-AAD. Таким образом, индуцированный



стауроспорином ядерной транслокации NF-κB недостаточно для защиты THP-1 клеток от гибели клеток, хотя NF-κB отвечает за транскрибирование многих генов, участвующих в предотвращении апоптоза. Этот анализ демонстрирует потенциал для мониторинга результата действия различных сигнальных путей одновременно, используя технологию проточной цитометрии изображений клеток ImageStream X Mk II.

UDC 576.5

## FLOW CYTOMETRY METHODS WITH CELL VISUALIZATION FOR RESEARCH IN MODERN IMMUNOLOGY

**Urusov D.**

*Merck LLC 115054, Moscow, Russia, Valovaya str. 35, floor 6, tel, +7(495)937-33-04 damir.urusov@merckgroup.com*

Demonstration of the potential for monitoring the outcome of diverse signaling pathways simultaneously using the ImageStream imaging cytometer.

**Key words:** imaging flow cytometry, nuclear proteins translocation and apoptosis.

Cellular images provide a wealth of information that can be rapidly interpreted by the knowledgeable observer. However, objective and statistically rigorous interpretation requires quantitative analysis of large numbers of images. The ImageStream Imaging Flow Cytometer captures large numbers of multi-spectral digital images and provides powerful analytical algorithms, enabling robust quantitation of image-based assays.

In this study, we combined the use of intensity- and morphology-based features to monitor staurosporine-induced NF-κB translocation and cell death in one assay. Staurosporine induced two morphologically distinct forms of cells death: 1) apoptosis as measured by increased intensity of activated caspase 3 staining, indicating effector caspase activation; and 2) necrosis, as measured by the nuclear image contrast gradient. Staurosporine also induced significant nuclear translocation of NF-κB, as determined by the similarity algorithm that measures the correlation between the NF-κB and 7-AAD nuclear images. Thus, staurosporine-induced nuclear translocation of NF-κB is insufficient to protect THP-1 cells from cell death, although NF-κB is responsible for transcribing many genes involved in prevention of the apoptotic process,

## ПЛАТФОРМЕННОЕ ПРОИЗВОДСТВО МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

**Волкова И. М.**

*ООО «Сарториус Стедим РУС», 199178, г. Санкт-Петербург, 5-я линия В.О., д. 70, лит. А, проходная № 4, 3 этаж, e-mail: Irina.Volkova@SARTORIUS.com*

В настоящее время такая группа лекарственных препаратов как моноклональные антитела становится все более и более востребованной в медицине. Раньше подобные исследования были доступны только очень крупным компаниям, способным инвестировать значительные суммы в разработку и масштабирование процесса, в оптимизацию продуцента и методов выделения. Однако нарабатанный опыт разработки подобных систем позволил контрактным разработчикам предложить готовые платформенные решения как для крупных производителей, так и для небольших стартапов. Основанная на одноразовых решениях технологическая платформа в сочетании с платформой разработки существенно снижает финансовые и временные затраты при масштабировании и промышленной реализации процесса и позволяет планировать финансово-экономические показатели на самых ранних этапах разработки.

**Ключевые слова:** контрактное производство, экономическая эффективность, моноклональные антитела, технологическая платформа, одноразовые решения, масштабирование

В настоящее время производство моноклональных антител из экзотики превратилось в один из стандартных индустриальных процессов. Основные методы производства неплохо описаны, однако существует множество нюансов, различающихся для каждого конкретного антитела и продуцента. Используя опыт многих успешно разработанных технологических линий, стало возможным создать технологическую платформу, способную унифицировать производство моноклональных антител и позволяющую работать с большинством продуцентов при минимальном уровне адаптации процесса. Основные этапы процесса, аффинная хроматография, удаление вирусов и инактивация низким рН, остаются общими для всех типов

моноклональных антител, а такие этапы как дополнительная хроматография на мембранных сорбентах и диафильтрация можно оптимизировать для наибольшей эффективности. Используя данные, полученные в процессе разработки, можно добиться максимальной эффективности производства. Те процессы, которые ранее требовали объемов реактора для получения продукта 10 000 л и более (при соответствующем расходе материалов на всех этапах производства), сегодня становятся доступны в реакторах объемом 500-2000 л, что позволяет использовать модульные, гибкие и универсальные одноразовые системы. Раньше подобные исследования были доступны только очень крупным компаниям, способным инвестировать значительные суммы в разработку и, что не менее важно, в масштабирование процесса, в оптимизацию продуцента и методов выделения. Однако наработанный опыт разработки подобных систем позволил контрактным разработчикам предложить готовые платформенные решения, покрывающие значительное количество вопросов, связанных с разработкой процесса производства. Готовые векторы и продуценты позволяют завершить разработку высокопродуктивной клеточной линии в сжатые сроки, заранее разработанная стратегия культивирования позволяет приступить непосредственно к оптимизации сразу же как будет получен рабочий клон, автоматические биореакторы, системы тангенциальной фильтрации и анализаторы позволяют проводить одновременно большой массив экспериментов, а системы анализа данных и дизайна экспериментов позволяют находить закономерности. Полученные в малом масштабе критические параметры процесса легко могут быть экстраполированы на больший масштаб, поскольку промышленные системы построены на принципе полного подобию экспериментальным. Все это, в сочетании с общим опытом конструирования, позволяет сократить время разработки и запуска производственной линии до полутора – двух лет, притом осуществлять этот процесс параллельно с регистрацией препарата. Таким образом, основанная на одноразовых технологиях технологическая платформа в сочетании с платформой разработки существенно снижает финансовые и временные затраты при масштабировании и промышленной реализации процесса и позволяет планировать финансово-экономические показатели на самых ранних этапах разработки.

## PLATFORM PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

**Volkova I. M.**

*LLC «Sartorius Stedim RUS», V. O., 5 liniya, d. 70, litera «A», pom. 110-120, 128-130/11N, 199178 Saint-Petersburg, Russia, e-mail: Irina.Volkova@SARTORIUS.com*

At present, such group of pharmaceuticals as monoclonal antibodies is becoming more and more in demand in medicine. Earlier such research works were available only for the huge companies, which could invest big money into the process development and upscale, into producers optimization and purification technology. Although the existing experience in development of such systems has given the possibility to CMO companies to offer the ready platform solutions both for giant biopharmaceutical producers, and for start-ups. This technological platform is based on the single-use technology which gives us the big advantage to decrease financial and timing costs during the upscale and final production in combining with development platform. It helps us to plan financial and economic indicators at the first steps of development.

**Key words:** CMO, contract production, economic effectiveness, monoclonal antibodies, technological platform, single-use systems, up-scale

At present, the production of monoclonal antibodies from exotics has turned into one of the standard industrial processes. The basic methods of production are well described, but there are many nuances that differ for each particular antibody and producer. Using the experience of many successfully developed technological lines, it became possible to create a technological platform capable of unifying the production of monoclonal antibodies and allowing to work with the majority of producers with minimal adaptation of the process. The main stages of the process: affinity chromatography, virus removal and inactivation with low pH, -remain common for all types of monoclonal antibodies, and such steps as additional chromatography on membrane sorbents and diafiltration can be optimized for getting maximum efficiency. Using the data, obtained during the development, you can achieve the maximum production efficiency. Those processes that previously required the volume of the bioreactor 10 000 liters or more (with the appropriate consumption of materials at all stages of production) are now available in the volumes of 500 - 2 000 liters. This solution allows us to use modular, flexible and universal single-use systems. Earlier such research works were available only for the huge companies, which could invest big money into the process development and upscale, into producers optimization and purification technology. But currently accumulated experience in development of such systems allowed solution suppliers (engineering companies, CROs and equipment suppliers) to offer the ready-to-use platform solutions which cover the majority of production development process. The ready to use vectors and hosts allow to complete the development of a highly productive cell line in a short time, the developed cultivation strategy allows to proceed directly to optimization as soon as the working clone

is obtained, automatic bioreactors, cross-flow systems and analyzers allow simultaneous large array of experiments, and data analysis systems and the design of experiments allow us to find patterns. The critical process parameters obtained in a small scale can easily be extrapolated to a larger scale, since small systems are built to be similar to industrial. All this, combined with the general design experience, allows to shorten the development and launch time of the production line up to one and a half to two years, and to carry out this process in parallel with the registration of the drug. Thus, a single-use technology platform combined with a development platform significantly reduces financial and time costs while scaling and industrial implementation of the process and allows you to plan financial and economic indicators at the earliest stages of development.

УДК 577.6.083.3.88

## ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОЛЯТОРОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОФАРМАЦЕВТИКЕ

Жером Ф.<sup>1</sup>, Гусева Е.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CH-4123 Алшвилль, Швейцария, SKAN AG, Биннингерштрассе, 116  
<sup>2</sup> 125047, Москва, Россия, Миусская пл., д.9, РХТУ им. Д.И. Менделеева

Изоляторные технологии широко используются в современном фармацевтическом и биофармацевтическом производстве, а также при проведении различных контрольных и аналитических процедур. Применение изоляторов позволяет защитить как производимый продукт, так и персонал от воздействия биологически опасных и/или токсичных веществ.

**Ключевые слова:** изоляторы, биофармацевтика, асептическое производство, клеточные технологии, регенеративная медицина.

В настоящее время большое внимание уделяется развитию фармацевтической промышленности в России с целью обеспечения населения отечественными лекарственными средствами, в том числе и производимыми биотехнологическим способом. Для проведения ряда технологических процессов, а также различных аналитических процедур необходимо обеспечить стерильные условия. Кроме того, в ряде случаев требуется обеспечить не только защиту продукта, но и защиту персонала. Асептическое производство и асептические технологии предъявляют жесткие требования к обеспечению полной стерильности исходного сырья, всех составляющих продукта и компонентов, вступающих в прямой контакт с асептически производимым продуктом. Продукт производится в контролируемой окружающей среде, в которой загрязнения частицами и микроорганизмами не должны превышать определенного уровня, а участие человека сведено к минимуму. Сохранение высокого уровня стерильности в процессе производства, а также высокий уровень защиты оператора могут быть обеспечены при использовании изоляторного оборудования. Особенно это важно для тех продуктов, которые нельзя подвергать финишной стерилизации.

Кроме того, развитие таких направлений как клеточные технологии и регенеративная медицина также требует проведения всех процессов в стерильных условиях. Использование изоляторов способствует повышению качества конечного продукта за счет улучшения мониторинга и контроля процесса, снижению риска загрязнения в течение работы, использованию цикла обеззараживания всей системы перекисью водорода без негативного воздействия на продукт. Применение изоляторных технологий позволяет снизить стоимостные затраты на подготовку и проведение процесса по сравнению с организацией «чистых» комнат.

UDK 661.12

## APPLICATION OF ISOLATORS IN BIOTECHNOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS

Jerome P.<sup>1</sup>, Guseva E.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CH-4123 Allschwil, Switzerland, SKAN AG, Binningerstrasse, 116  
<sup>2</sup> 125047, Moscow, Russia, Miuskaya Sq., 9, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia  
Email: eguseva@rally-online.ru

Isolator technologies are widely used in modern pharmaceutical and biopharmaceutical productions, as well as in various control and analytical procedures. The use of isolators makes it possible to protect both the product and the operator from exposure to biologically hazardous and / or toxic substances.

**Key words:** isolators, biopharmaceutics, aseptic production, cell technologies, regenerative medicine.

At present, much attention is paid to the development of the pharmaceutical industry in Russia with a view to providing the population with domestic medicines, including those produced by the biotechnological method. To carry out a number of technological processes, as well as various analytical procedures, it is necessary to provide sterile conditions. In addition, in some cases it is required to provide not only product protection, but also operator protection too. Aseptic production and aseptic technologies impose strict requirements to ensure complete sterility of the raw material, all components of the product and components coming into direct contact with the aseptic product. The product is produced in the controlled environment in which the contamination by particles and microorganisms should not exceed a certain level, and human participation is minimized. The preservation of sterility high level in the production process, as well as high level of operator protection, can be provided with the use of isolators. This is especially important for those products that can not be sterilized.

In addition, the development of such areas as cell technologies and regenerative medicine requires the organization of all processes under sterile conditions. The use of isolators increases the quality of the final product by improving the monitoring and control of the process, reducing the risk of contamination during work, using the cycle of decontamination of all system with hydrogen peroxide without adversely affecting the product. The use of isolator technologies allows to reduce the cost of preparation and implementation of the process in comparison with the organization of clean rooms.

УДК: 615.272.014: 576.311.347.3

## ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫЕ ФЕНОЛЫ – АНТИОКСИДАНТЫ КАК АДАПТОГЕНЫ К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

**Жигачева И.В., Голощанов А.Н.**

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, 4,  
e-mail: zhigacheva@mail.ru

На примере пространственно затрудненных фенолов фенозана калия и анфена натрия показано наличие антистрессовых свойств у пространственно затрудненных фенолов. Протекторная активность препаратов, вероятно, обусловлена снижением интенсивности процессов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий, что предотвращает дисфункцию этих органелл.

**Ключевые слова:** стресс, митохондрии, активные формы кислорода, антиоксиданты.

Стрессовые воздействия приводят к смещению антиоксидантно - прооксидантного равновесия в сторону увеличения генерации АФК митохондриями, что часто сопровождается развитием патологических состояний [1]. Мы предположили, что препараты, обладающие антиоксидантной активностью, вероятно, будут предупреждать дисфункцию митохондрий при стрессовых воздействиях. Известно, что пространственно-затрудненные фенолы в большинстве случаев обладают антиоксидантными свойствами [2]. В связи с этим в качестве адаптогенов исследовали антиоксиданты из группы пространственно затрудненных фенолов: фенозан калия (калиевая соль 2,6-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-пропионовой кислоты) и анфен натрия (1-карбоксит-1- (N-метиламид) - 2- (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилпропионат натрия). Антистрессовые свойства препаратов изучали на модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ). ОГГ приводила к 1,5-3-кратному увеличению интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени крыс. При этом наблюдалось снижение относительного процентного содержания ненасыщенных жирных кислот (ЖК) с 18 атомами углерода и увеличение содержания стеариновой кислоты в липидной фракции мембран митохондрий, что приводило к снижению  $\sum C_{jn}/C_{18:0}$ , где  $C_j$  – содержание ненасыщенных жирных кислот (относительные проценты), n – двойных связей. Если в контроле это соотношение было  $2,70 \pm 0,12$ , то при ОГГ оно снижалось до  $1,18 \pm 0,20$ . При введении животным 10-13М фенозана калия или 10-6М анфена натрия это соотношение приближалось к контрольным величинам ( $2,92 \pm 0,23$  и  $2,79$  соответственно) даже в условиях ОГГ. Изменения в липидном составе мембран митохондрий, вероятно, отражались и на активности ферментов, ассоциированных с мембранами, а именно: на активности ферментов дыхательной цепи митохондрий. Действительно, ОГГ приводила к снижению 25% снижению максимальных скоростей окисления НАД-зависимых субстратов и 35% уменьшению эффективности окислительного фосфорилирования. Введение крысам 10-13М фенозана калия или 10-6М анфена натрия за 45

минут до воздействия предотвращало изменения функциональных характеристик митохондрий печени: скорости окисления НАД-зависимых субстратов как в присутствии АДФ, так и в присутствии FCCP не отличались от контрольных значений. Величина дыхательного контроля была сопоставима с соответствующими значениями в контрольной группе животных. При этом препараты предотвращали активацию ПОЛ и изменение жирнокислотного состава мембран митохондрий, что свидетельствовало о коррекции препаратами функциональных характеристик митохондрий. Предполагается, что протекторное действие исследуемых препаратов, возможно, обусловлено предотвращением окисления ненасыщенных жирных кислот, главным образом линолевой кислоты, основной кислоты входящей в состав кардиолипина, способствуя сохранению высокой функциональной активности этих органелл.

Литература:

1. Тодоров И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий, процессе старения и апоптозе// Рос. хим. Журнал. \_ 2007, Т.51.\_ С. 93-106
2. Ершов В, Никифоров Г, Володькин А. Пространственно затрудненные фенолы: - М.: Наука, 1972, 352с.

UDC 615.272.014: 576.311.347.3

## SPATIAL HINDERED PHENOLS - ANTIOXIDANTS AS ADAPTOGENS TO STRESS IMPACT

Zhigacheva I.V., Goloshchapov A. N

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, street Kosygina, 4, Moscow, 119334 Russia ; e-mail:zhigacheva@mail.ru

The presence of anti-stress properties in spatially hindered phenols is shown using the example of spatially hindered phenols: of potassium phenosan and sodium anphen. The protective activity of drugs is probably due to a decrease in the intensity of lipid peroxidation processes in mitochondrial membranes, which prevents the dysfunction of these organelles.

**Key words:** stress, mitochondria, reactive oxygen species, antioxidants.

Stressful impacts leads to a shift in the antioxidant - prooxidant balance toward increasing the generation of ROS by mitochondria, which is often accompanied by the development of pathological conditions [1]. We suggested that that drugs with antioxidant activity are likely to prevent dysfunction of mitochondria under stress conditions. It is known that the spatially hindered phenols in most cases have antioxidant properties [2]. In this connection, as adaptogens investigated antioxidants from the group of sterically hindered phenols: potassium phenosan (potassium salt of 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl-propionic acid) and sodium anphen (1-carboxy-1-(N-methylamide) - 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-phenyl-propionate sodium). Anti-stress properties of drugs were studied in the model of acute hypobaric hypoxia (AHH). AHH resulted in a 1.5-3-fold increase in the fluorescence intensity of LPO products in membranes of rat liver mitochondria. A decrease in the relative percentage of unsaturated fatty acids with 18 carbon atoms and an increase in the stearic acid content in the lipid fraction of the mitochondrial membranes was observed, which led to a decrease in  $\Sigma C_j n / C_{18:0}$ , where  $C_j$  is the content of unsaturated fatty acids (relative percent),  $n$  - double bonds. If in the control this ratio was  $2.70 \pm 0.12$ , then with AHH it decreased to  $1.18 \pm 0.20$ . When administered to animals 10-13M potassium phenosan or 10-6M sodium anphen, this ratio approached the control values ( $2.92 \pm 0.23$  and  $2.79$ , respectively), even under conditions of AHH. Changes in the lipid composition of mitochondrial membranes, probably had an impact on the activity of enzymes associated with the membrane, namely on the activity of enzymes of the respiratory chain of mitochondria. Indeed, AHH resulted in a reduction in the maximum rates of oxidation of NAD-dependent substrates. At the same time, the maximum oxidation rates of NAD-dependent substrates decreased by 25% and the efficiency of oxidative phosphorylation decreased by 35%. Administration to rats of 10-6M sodium anphen or 10-13 M potassium phenosan 45 minutes before to exposure prevented changes of the functional characteristics of liver mitochondria: the rates of NAD-dependent substrates oxidation in the presence of ADP and in the presence of FCCP did not differ from control rates. The respiratory control rates were comparable with corresponding rates in control group animals. The drugs prevent the activation of LPO and changing the fatty acid composition of mitochondrial membranes, that indicating a correction of the functional characteristics of mitochondria.

It is assumed that the protective effect of the preparations being studied may be due to the prevention of oxidation of unsaturated fatty acids, mainly linoleic acid, which is part of the lipid fraction of mitochondrial membranes, contributing to the preservation of high functional activity of these organelles.

References:

1. Todorov I.N. *Mitochondria: Oxidative Stress and Mutations of Mitochondrial DNA in the Development of Pathologies, Aging and Apoptosis*// *Ross. Chem. Journal*. 2007. Vol.51.P. 93-106/
2. Ershov V, Nikiforov G, Volodkin A. *Spatially hindered phenols: - M. : Nauka, 1972, 352p.*

УДК 615.017

## РАЗРАБОКА МЕТОДА И ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛ МИРНК И ПЕПТИДНЫХ НОСИТЕЛЕЙ

Мурашко Н.В.,<sup>1</sup> Шиловский И.П.,<sup>2</sup> Тимофеева А.В.,<sup>2</sup> Андреев С.М.,<sup>2</sup> Смирнов В.В.,<sup>1,2</sup> Хаитов М.Р.<sup>2</sup>

1. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, Россия
2. Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия  
119435, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4  
e-mail: murashko.nv@yandex.ru1

Создана методика для изучения фармакокинетики комплексных препаратов, состоящих из молекул миРНК и пептидных носителей. Показано, что подобные препараты обладают коротким периодом полувыведения, а катионный пептидный носитель имеет аттракцию к ткани легких.

**Ключевые слова:** фармакокинетика, пептид, ВЭЖХ, молекулы миРНК.

Открытие интерференции РНК позволило разработать новые лекарственные препараты, в которых молекулы малых интерферирующих РНК (миРНК) выступают в качестве фармацевтической субстанции [2,3]. Для эффективной доставки миРНК применяют специальные носители (пептиды, полимеры, липосомы и др.) [1]. Проблема изучения фармакокинетики таких препаратов заключается в сложности селективной детекции, ввиду присутствия в организме сходных по природе эндогенных соединений. Целью данной работы являлась разработка методики изучения фармакокинетики комплекса, состоящего из молекул миРНК и пептидного носителя LTP (миРНК/LTP), а также изучение его фармакокинетических параметров при внутривенном введении мышам.

Методы. Определяемые вещества (миРНК и LTP) были мечены флуоресцентными метками VIC и Cy5, соответственно. VIC присоединяли по 3'-концу антисмысловой цепи миРНК; Cy5 вводили по S-H-группе цистеина LTP. Метки отличались длиной волн (для Cy5-670 нм, для VIC-554 нм), что позволило в одном био-образце детектировать оба компонента одновременно. В качестве метода анализа использовали ВЭЖХ с флуориметрической детекцией. Мышам самкам линии BALB/c весом 20-22 г, возрастом 6-8 недель вводили препарат миРНК/LTP в дозе 100 мкг внутривенно и через 2, 15, 20, 30, 45 и 60 минут у них была взята кровь. Через 2, 30 и 60 минут после введения комплекса были взяты органы: почки, печень, легкие и мозг. Органы были гомогенизированы с последующей экстракцией меток и определением концентраций миРНК и LTP вышеуказанным методом.

Максимальная концентрация компонентов комплекса в крови выявлена сразу после введения препарата (через 2 мин), а через 45 минут после введения компоненты не детектировались. Период полувыведения для обоих компонентов был сходен и составил 2,2 и 2,4 минут для LTP и миРНК, соответственно. При изучении распределения комплекса в органах было установлено, что оба компонента максимально накапливаются в легких; Стах составило 160 и 14 нг/орган, соответственно. Период полувыведения из легких составил 18,4 и 5,8 минут, что свидетельствует о тропности носителя в составе препарата к данному органу.

Была создана методика для изучения фармакокинетики комплексных препаратов, состоящих из молекул миРНК и пептидных носителей, заключающаяся в химическом присоединении флуоресцентных меток с последующей их селективной детекцией. Показано, что подобные препараты обладают коротким периодом полувыведения, а катионный пептидный носитель имеет аттракцию к ткани легких. Поддержано РФФИ № 17-04-01080.

Литература:

1. Колоскова О.О., Носова А.С., Илюхина А.А. и др. Липосомальные средства доставки миРНК // *Биофармацевтический журнал*. -2017. -Т.9. №5. -С.3-10.
2. Хаитов М.Р., Литвин Л.С., Шиловский И.П. и др. Интерференция РНК. Новые подходы к разработке противовирусных препаратов // *Иммунология*. -2010. -Т.31, № 2. -С. 69-76.
3. Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р. и др. Интерференция РНК - новый подход в терапии аллергической бронхиальной астмы // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. -2016. - Т.79. № 4. -С. 35-44.

UDC 615.017

## DEVELOPMENT OF THE METHOD AND THE STUDY OF PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF COMPOUNDS BASED ON SIRNA MOLECULES AND PEPTIDE CARRIERS

**Murashko N.V.,<sup>1</sup> Shilovskiy I.P.,<sup>2</sup> Timofeeva A.V.,<sup>2</sup> Andreev S.M.,<sup>2</sup> Smirnov V.V.,<sup>1,2</sup> Khaitov M.R.<sup>2</sup>**

1. Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation.
2. National Research Center - Institute of Immunology, FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation 119435, Moscow, Bolshaya Pirogovskaya str., 2, p. 4

The method to study of pharmacokinetics of complexes of siRNAs and peptides, which based on the use of fluorophores was developed. Using this method, we have shown that these complexes demonstrate short half-life period and the peptide carrier substantially accumulated in the lungs.

**Key words:** pharmacokinetics, peptide, HPLC.

The discovery of RNA interference as a method for the safe and efficient suppression of gene expression, helped to develop new medicines (drugs) in which the molecules are small interfering RNA (siRNA) as a substance [2,3]. For efficient delivery of siRNA special carriers of the different nature (peptides, polymers, liposomes, etc.) are used [1]. The problem of the pharmacokinetic study of the complex of siRNA and cationic peptide (LTP), is the difficulty of its selective detection, by reason of the presence in the body endogenous RNAs and peptides. The aim of this work is to develop methods for the study of the pharmacokinetics of the complex of siRNA/LTP and to study its pharmacokinetic parameters when administered intravenously.

Since the detection of siRNAs and LTP is extremely difficult the analyte was labeled with a fluorescent tag (siRNA-VIC, LTP-Cy5), in order to be detected in a biological object. Cy5 attached at the 3'-end of antisense siRNA chain; the label VIC has introduced the S-H group of cysteine of the peptide LTP. These labels are different in wave length (Cy5-670 nm VIC-554 nm), allowing in one bio-sample to detect both components of the complex simultaneously. The method of analysis was selected using HPLC with fluorometric detector. The study used female mice of line BALB/c weighing 20-22 g, 6-8 weeks of age. Mice were injected with siRNA/LTP complex in dose 100 µg/mouse. After 2, 15, 20, 30, 45 and 60 minutes the blood was taken for the obtaining of serum. Animals were euthanized after 2, 30 and 60 minutes after injection of complex and organs (kidneys, liver, lungs and brain) were taken. Organs were homogenized for subsequent analysis by chromatography.

The maximum concentration of the components of the complex was detected in the blood immediately after injection (2 min), and 45 minutes after the injection components of the complex were not detected in the blood. The half-life period for both components was similar assessed as 2.2 and 2.4 minutes for LTP and siRNA, respectively. The study of the distribution of the complex in organs we have revealed that both component substantially accumulated in the lungs; C<sub>max</sub> was 160 and 14 ng/organ, respectively. Half-life period from the lungs was 18.4 and 5.8 minutes for LTP and siRNA, respectively, that indicated the affinity of this peptide carrier to this organ.

The method to study of pharmacokinetics of complexes of siRNAs and peptides, which based on the use of fluorophores was developed. Using this method, we have shown that these complexes demonstrate short half-life period and the peptide carrier substantially accumulated in the lungs. Supported by RFBR № 17-04-01080.

References:

1. Koloskova O.O., Nosova A.S., Ilyukhina A.A. et al. Liposomal siRNA delivery systems // *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2017. V. 9. № 5. P. 3-10.
2. Khaitov M.R., Litvin L.S., Shilovskiy I.P. et al. RNA interference. New approaches to the development of antiviral agents // 2010. V. 31. № 2. P. 69-76.
3. Shilovskii I.P., Prozorova M.S., Gaisina A.R. et al. RNA Interference: New Approach to the Treatment of Allergic Asthma // *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2016. V. 79. № 4. P. 35-44.

УДК 62.13.227

## РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ «МОЗГ-НА-ЧИПЕ» ДЛЯ СКРИННИНГА НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Христиченко А. Ю.<sup>1,2</sup>, Газарян И. Г.<sup>2</sup>, Полозников А. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва, Россия, 141701, Институтский переулок, д.9

<sup>2</sup> НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, 117198, Москва, Россия, ул. Саморы Машела, д.1

Получена модель «мозг-на-чипе», содержащая линии нейробластомы человека SH-SY5Y, стабильно экспрессирующие репортерные конструкции HIF1 ODD-Luc и Neh2-Luc, культивируемые в микрофлюидном чипе. Данная модель позволяет проводить скрининг различных соединений с целью поиска нейропротекторных препаратов.

**Ключевые слова:** нейродегенеративные заболевания, нейропротекторные препараты, репортерные конструкции, микрофлюидный чип

С развитием понимания механизмов различных нейродегенеративных заболеваний растет количество исследований, связанных с поиском и разработкой препаратов, обладающих нейропротекторными свойствами. В связи с этим актуальной представляется задача создания *in vitro* модели, максимально приближенной к *in vivo* условиям, и позволяющей проводить высокоэффективный скрининг нейропротекторных соединений. Клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y широко используется в лабораторной практике в качестве нейронной модели, так как при дифференцировке демонстрирует множество биохимических и функциональных свойств нейронов. Ранее нами была показана эффективность использования репортерных линий SH-SY5Y, стабильно экспрессирующих люциферазные конструкции, содержащие часть кислород-чувствительного домена транскрипционного фактора Hif1 (HIF1 ODD-Luc) и домен, отвечающий за деградацию транскрипционного фактора NRF2 (Neh2-Luc), для проведения скринингов нейропротекторных препаратов. [1,2] Проведенные скрининги позволили идентифицировать новые соединения, стабилизирующие транскрипционные факторы Hif1 и NRF, и запускающие антигипоксические и антиоксидантные генетические программы, необходимые для выживания клеток в условиях хронической и острой нейродегенерации. В данной работе из дифференцированных клеток линии SH-SY5Y, стабильно экспрессирующих репортерные конструкции HIF1 ODD-Luc и Neh2-Luc, были построены трехмерные гистотипические клеточные модели «мозг-на-чипе». Репортерные линии помещались в разработанный микрофлюидный чип из полидиметилсилоксана (ПДМС), который был создан с использованием технологии «мягкой литографии». (Рис. 1) Для чипа предусмотрен адаптер, который позволяет помещать его в обычные люминометры, позволяющие измерять люминесценцию в реальном времени. Таким образом, разработанная технология позволяет следить за стабилизацией транскрипционных факторов в реальном времени и может быть использована для проведения скринингов нейропротекторных препаратов в условиях наиболее приближенных к условиям человеческого организма.

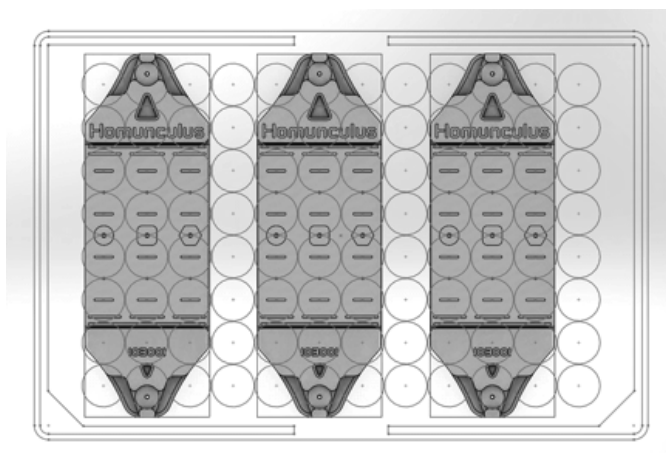


Рис.1 – Схема микрофлюидного чипа

Работа поддержана фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, грант #24465.



Литература:

1. Smirnova N.A., Haskew-Layton R.E., Manuela Basso, Gazaryan I.G. et al. Development of Neh2-Luciferase Reporter and Its Application for High Throughput Screening and Real-Time Monitoring of Nrf2 Activators. *Chem Biol.* 2011 Jun 24; 18(6): 752–765.
2. Poloznikov A.A., Smirnova N.A., Khristichenko A.Yu., Gazaryan I.G. et al. Antioxidant and antihypoxic properties of neuroprotective drugs. *Russian Chemical Bulletin* 2016, 65 (12): 2970–297

UDC 62.13.227

## DEVELOPMENT OF A “BRAIN-ON-A-CHIP” MODEL FOR SCREENING OF NEUROPROTECTIVE DRUGS

Khristichenko A. <sup>1,2</sup>, Yu., Ghazaryan I. G. <sup>2</sup>, Poloznikov A. A. <sup>2</sup>

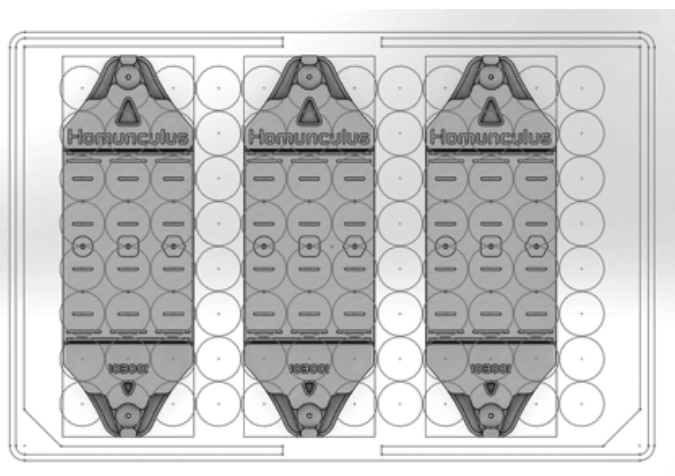
<sup>1</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow, Russia, 141701, Institutsky pereulok, 9

<sup>2</sup> Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, 117198, Moscow, Russia, st. Samory Mashel, 1

A “brain-on-chip” model containing SH-SY5Y human neuroblastoma expressing reporter constructs and cultured in microfluidic chip was obtained. This model allows to screen various compounds in order to search for neuroprotective drugs.

**Key words:** neurodegenerative diseases, neuroprotective drugs, reporter constructs, microfluidic chip

Increasing understanding of the neurodegenerative diseases’ pathogenesis leads to the growth in the number of researches on the neuroprotective compounds. The development of in vitro model which would be as close as possible to in vivo conditions will greatly simplify the search of such compounds. The SH-SY5Y neuroblastoma cell line is widely used as a neuronal model, as these cells possess many biochemical and functional properties of neurons. Previously we have demonstrated the efficiency of using luciferase fusion reporters stably expressed in neuroblastoma cell line – HIF1ODD-luc and Neh2-luc reporters - for high-throughput screening. [1, 2] Such screenings permit identification of novel molecules stabilizing the corresponding transcription factors - HIF and Nrf2 – and thus, inducing antihypoxic and antioxidant genetic programs necessary for cell survival under conditions of chronic and acute neurodegeneration. In this work a 3D human hystotypical cell model, “brain-on-a-chip”, has been created using differentiated neuroblastoma cell lines stably expressing HIF1ODD-luc and Neh2-luc reporters. Neuroblastoma cell lines transformed with the reporter constructs have been put in the corresponding microfluidic chip. A novel microfluidic chip made of PDMS/glass using soft lithography technique has been developed. (Pic.1) The chips can be organized in a special adapter for compatibility with common microplate fluorimeters allowing real-time imaging and fluorescence measurement. Thus, the developed technology allows us to monitor the stabilization of transcription factors in the continuous regime and can be used for screening of neuroprotective drugs in conditions most close to the conditions of the human body.



Pic.1 – Scheme of microfluidic chip

The work is supported by Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises grant #24465.

## References:

1. Smirnova N.A., Haskew-Layton R.E., Manuela Basso, Gazaryan I.G. et al. Development of *Neh2-Luciferase Reporter* and Its Application for High Throughput Screening and Real-Time Monitoring of *Nrf2* Activators. *Chem Biol.* 2011 Jun 24; 18(6): 752–765.
2. Poloznikov A.A., Smirnova N.A., Khristichenko A.Yu., Gazaryan I.G. et al. Antioxidant and antihypoxic properties of neuroprotective drugs. *Russian Chemical Bulletin* 2016, 65 (12): 2970–297

УДК 663.15

## СЕЛЕКЦИЯ АКТИВНЫХ КОЛОНИЙ *CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КЛОНИРОВАНИЯ

**Смирнова Е.С., Слугина О.А., Соколова Ю.О., Зайцева Е.С.**

Федеральное унитарное государственное предприятие «Санкт - Петербургский научно - исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико - биологического агентства.

Санкт-Петербург, Россия

198320, Санкт-Петербург, Красное Село, ул. Свободы, д. 52

e-mail: e.s.holopova@spbniivs.ru

В результате работы получены образцы гомогенной культуры, обладающие повышенной продуктивностью коллагеназ. Данный метод селекции *Clostridium histolyticum* позволит повысить промышленный выход коллагеназ.

**Ключевые слова:** *Clostridium histolyticum*, гомогенная культура, коллагеназы, коллагеназная активность, продуктивность, селекция.

Основной способ получения коллагеназ в промышленности – микробиологический синтез с использованием *Clostridium histolyticum*. Этот вид обнаруживается в фекалиях и почве. *C. histolyticum* подвижные грамположительные факультативные анаэробы, короткие палочки длиной 3-5 мкм, расположенные попарно или в коротких цепочках. *C. histolyticum* могут быть причиной газовой гангрены в ассоциации с другими видами бактерий. *C. histolyticum* гидролизуют до аминокислот белки и пептиды субстрата. Наиболее благоприятными питательными средами для культивирования *C. histolyticum* являются среды, состоящие из компонентов животного происхождения.

Снижение продуктивности *C. histolyticum* может быть вызвано неоднородностью биомассы. Каждая клетка синтезирует различное количество коллагеназ. Также каждый клон может оказывать негативное влияние на процессы метаболизма другого. В процессе исследовательской работы проведена селекция культуры *C. histolyticum*.

Для выделения клонов проводили посев суспензии клеток гетерогенной культуры, с рабочей концентрацией 101 КОЕ/мл, в толщу питательного агара. После культивирования в течение 44 часов из агара механическим путем извлекли 41 колонию для проведения эксперимента. Накопление посевного материала проводили на полужидкой питательной среде Рамона. Последующее культивирование клонов вели на питательном бульоне Рамона, обогащенном глюкозой. Клоны инкубировали в течение (44±2) часов при температуре 37°C в термостате. Полученную культуральную жидкость гомогенной культуры оценивали по микро-, макроморфологическим и физико-химическим свойствам. Клетки отделяли путем фильтрации культуральной жидкости через стерилизующие фильтрующие насадки. Полученные нативные растворы коллагеназ исследовали по следующим параметрам: содержание белка, коллагеназная активность и клострипаиновая активность. В качестве контроля использовали раствор коллагеназ, полученный после стерилизующей фильтрации культуральной жидкости исходной гетерогенной культуры, полученной при тех же условиях. Выделены 11 образцов гомогенной культуры с наиболее высокой продуктивностью. Отобранные клоны подверглись повторному аналогичному изучению. В результате удалось выделить 4 образца гомогенной культуры, продуктивность которых превышает продуктивность гетерогенной культуры на 10-20 %.

В результате проведенного исследования установлено, что исходная культура *C. histolyticum* неоднородна и требует селективного отбора наиболее продуктивных клонов. Только часть колоний обладает высокой продуктивной способностью по отношению к гетерогенной культуре. Остальные клоны продуцируют коллагеназы сходной или меньшей активности, чем ферменты исходной культуры. Поэтому следует проводить регулярную селекцию с целью выделения наиболее активных клеток продуцента *C. histolyticum* для повышения производственного выхода коллагеназ.

Литература:

1. Конев, С. В. Фотобиология. Издание 2-е, перераб. и доп. / С.В. Конев, И.Д. Волоотовский. – Минск: Издательство БГУ им. В. И. Ленина, 1979. – 385 с.
2. Биохимия: Учеб. для вузов. / под ред. Е.С. Северина. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2003. – 779 с.
3. Можина, Н.В. Коллагенолитические ферменты патогенных микроорганизмов / Н.В. Можина, Г.Н. Руденская // Биомедицинская химия. – 2004. – №6. – с.539-553.

UDK 663.15

## SELECTION OF ACTIVE COLONIES OF CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM USING METHOD OF CLONING

**Smirnova E.S., Slugina O.A., Sokolova J.O., Zaytseva E.S.**

*The federal state unitary enterprise "The Saint - Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations" of Federal medical and biologic agency.*

*Saint - Petersburg, Russia*

*198320, Saint - Petersburg, Krasnoe Selo, Svobody st., 52*

*e-mail: e.s.holopova@spbniivs.ru*

As a result we have found samples of homogeneous culture with increased ability to produce collagenase. Selection of *Clostridium histolyticum* can increase level of collagenases's production.

**Key words:** *Clostridium histolyticum*, homogeneous culture, collagenases, activity of collagenases, productivity, selection.

The main method of collagenase production is microbiological synthesis with the usage of *Clostridium histolyticum*. This species which typically habitat on the feces and the soil. *C. histolyticum* is a motile gram-positive facultative anaerobe, rod shaped 3-5 µm long, which clumping in pairs or short chains. *C. histolyticum* can be a cause of gas gangrene in association with other bacterial species. *C. histolyticum* hydrolyzes the substrate containing proteins and peptides to amino acids. The best substrates for cultivation of *C. histolyticum* are substrates with animal origin components.

The decreasing of productivity of *C. histolyticum* can be connected to heterogeneity of biomass. Each cell produces different quantity of collagenases. Also each cell negatively affects to other cells metabolism. We performed selection of clones of *C. histolyticum* in research.

For the screening of the clones, we added a suspension of a heterogeneous culture with a cell concentration of 101 CFU / ml into the nutrient agar. 41 colonies picked up mechanically from agar after incubation for 44 hours. The inoculum was prepared in semi-liquid Ramon's agar. Clones from initial heterogeneous culture were cultivated in Ramon's broth, which was enriched with glucose. It was incubated in thermostat at a temperature of 37°C for (44±2) hours. Then the cultural liquid was tested on micro-, macromorphological and physico-chemical characteristics.

The cells were separated with syringe filters. Following biochemical parameters of the native fluid of collagenases were tests: concentration of protein, activity of collagenases and activity of clostripain. As a sample for comparison was used solution of collagenases, which was filtered from cultural liquid from initial heterogeneous culture under similar conditions. We got 11 samples of homogeneous culture with increased ability to produce collagenases. The second research was held for the selected clones. As a result we got 4 samples of homogeneous culture, which productivity higher than the productivity of heterogeneous culture in 10 to 20 %.

After experiment it would be noted that initial culture *C. histolyticum* is heterogeneous and selections of active clones are needed. Only part of the clones has high productivity relatively the heterogeneous culture. Other clones produce collagenases with the same activity or less than heterogeneous culture. Thus regular selection of the active clones of *C. histolyticum* is needed to keep increased level of collagenases's production.

References:

1. Konev S.V., Volotovskiy I.D. *Fotobiologiya [Photobiology]*. Minsk, V.I. Lenin's BGU Publ. 1979. 385 p.
2. Severin E.S. *Biokhimiya [Biochemistry]*. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2003. 779 p.
3. Mozhina N.V., Rudenskaya G.N. *Collagenolytic enzymes of pathogenic microorganisms. Biomeditsinskaya khimiya [Biomedical chemistry]*, 2004, no. 6, pp. 539-553. (in Russian).

УДК 606:577.151.5

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДСОРБЦИОННОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ А-АМИЛАЗЫ НА РАЗЛИЧНЫХ СОРБЕНТАХ

Красовицкая И. А., Котова Н.В., Глазова Н.В.

Санкт-Петербургский Государственный химико-фармацевтический университет, Россия  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 14  
e-mail: Krasovizkaya.Irina@pharminnotech.com

В работе представлены результаты экспериментов по изучению равновесных и кинетических параметров сорбции  $\alpha$ -амилазы на карбоксильном катионите С-106 и сверхсшитых полистирольных сорбентах. Выбран сорбент для получения комплексного ферментного препарата.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -амилаза, сорбенты, сверхсшитый полистирол, иммобилизация.

Фермент  $\alpha$ -амилаза используется в заместительной энзимотерапии для лечения амилазной недостаточности и желудочно-кишечных заболеваний. Применение нативной  $\alpha$ -амилазы затрудняется ввиду её инактивации при низких значениях pH [1, 2], необходимо получение стабильной лекарственной формы, устойчивой в кислой среде желудка и проявляющей свою активность в кишечнике. Актуальным является получение комплекса  $\alpha$ -амилазы с сорбентом, на основе которого можно создать лекарственную форму, представляющую собой легкораспадающиеся таблетки. Такая лекарственная форма более удобна для применения, чем те, которые присутствуют в данный момент на рынке (капсулированные или покрытые оболочкой лекарственные формы фермента) [3]. Ранее нами рассматривалась возможность получения комплекса  $\alpha$ -амилазы с карбоксильным катионитом С-106 [4]. Перспективным представляется исследование процесса иммобилизации  $\alpha$ -амилазы на сверхсшитых полистирольных сорбентах. Одним из достоинств сорбентов на основе сверхсшитого полистирола является возможность их использования в качестве энтеросорбентов [5]. Благодаря этому свойству потенциальный препарат  $\alpha$ -амилазы, иммобилизованной на полистирольном сорбенте, приобретает дополнительное положительное качество.

В данной работе представлены результаты изучения процесса иммобилизации  $\alpha$ -амилазы с целью подбора сорбента для создания комплексного ферментного препарата. Объектами исследования являлись слабокислотный катионит С-106 и сверхсшитые полистирольные сорбенты: неионогенные MN-200 и MN-202 и сильнокислотный сульфокатионит MN-500. В качестве сырья для получения  $\alpha$ -амилазы использовался технический ферментный препарат амилосубтилин ГЗХ (*Bacillus subtilis*). Сравнительный анализ равновесных и кинетических параметров процесса сорбции  $\alpha$ -амилазы на сорбентах С-106, MN-200, MN-202 и MN-500 показал, что для создания комплекса с  $\alpha$ -амилазой может быть предложен сверхсшитый полистирольный сорбент MN-202. Для данного сорбента характерна высокая ёмкость и избирательность сорбции, он обладает хорошими кинетическими характеристиками. Кроме того, получение лекарственного препарата на основе комплекса  $\alpha$ -амилазы с MN-202 даёт возможность сочетать свойства ферментного препарата и энтеросорбента.

### Литература:

1. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylases from various *Bacillus* strains / S. Mitsuiki, K. Mukae, M. Sakai, M. Goto, S. Hayashida, K. Furukawa // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2005. - №37. – pp. 410-416
2. Basic Aspects of Digestion and Absorption / G. T. Wahbeh, D. L. Christie // *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease*. - Elsevier Inc., 2011. – pp. 10-19
3. Григорьева, Е. П. Совместная сорбционная иммобилизация гидролитических ферментов  $\alpha$ -амилазы, протеазы *BACILLUS SUBTILIS* и витамина В12 на полимерном носителе: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Григорьева Екатерина Павловна. – СПб, 2001. – 142 с.
4. Красовицкая, И. А. Изучение адсорбционной иммобилизации  $\alpha$ -амилазы на различных носителях / И. А. Красовицкая, Н. В. Котова, Н. В. Глазова // *Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнологии в комплексном развитии регионов», 15-17 марта 2016 г.* – М.: ООО «Экспо-биохим-технологии», ООО «РЭД ГРУПП», 2016. – с. 77
5. Сорбционное концентрирование аминазина на неионогенных и ионогенных полимерах / И. В. Шкутина [и др.] // *Химико-фармацевтический журнал*. Т43, №9. – 2009. – с. 50-52

UDC 606:577.151.5

## COMPARATIVE ANALYSIS OF ADSORPTION IMMOBILIZATION OF $\alpha$ - AMYLASE ON VARIOUS SORBENTS

**Krasovitskaya I. A., Kotova N. V., Glazova N. V.**

*Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, Russia  
14, Prof. Popov St., Saint-Petersburg, 197376, Russian federation  
e-mail: Krasovizkaya.Irina@pharminnotech.com*

Experimental results of investigation of equilibrium and kinetic sorption parameters of  $\alpha$ -amylase on carboxyl cation exchanger C-106 and overstitched polystyrene sorbents are presented in this work. Sorbent is chosen for obtaining of complex enzyme drug.

**Key words:**  $\alpha$ - amylase, sorbents, overstitched polystyrene, immobilization.

$\alpha$ -Amylase is used in replacement enzyme therapy for treatment of amylase deficiency and gastrointestinal disturbance. Application of native  $\alpha$ -amylase is complicated considering its inactivation in low pH values [1, 2], it is important to obtain a stable dosage form which will be steady in acidic stomach media and will be releasing its activity in the intestine. Obtaining of  $\alpha$ -amylase-sorbent complex is perspective and based on this complex new formulation (easily degrading tablets) can be created. This formulation is more convenient for usage than these presented on the market at this moment (capsulated or coated dosage forms) [3]. Possibility of complex of  $\alpha$ -amylase with carboxyl cation-exchange resin C-106 preparation was considered earlier [4]. Investigation of  $\alpha$ -amylase immobilization on overstitched polystyrene sorbents is admitted to be perspective. One of the advantages of overstitched polystyrene-based sorbents is the possibility of usage as enterosorbents [5]. Because of this property a new potential  $\alpha$ -amylase drug immobilized on a polystyrene sorbent will receive additional favourable quality.

Results of investigation of  $\alpha$ -amylase immobilization process with the aim to create a complex enzyme drug are presented in this work. The objectives of the investigation were weak-acid cation-exchange resin C-106 and overstitched polystyrene sorbents: non-ionogenic MN-200 and MN-202 and strong-acid sulfonic cation-exchange resin MN-500. Industrial enzyme drug amylosubtilin G3X (*Bacillus subtilis*) was used as a raw material for  $\alpha$ -amylase obtaining. Comparative analysis of equilibrium and kinetic parameters of process of  $\alpha$ -amylase sorption on such sorbents as C-106, MN-200, MN-202 и MN-500 showed that for the creation of complexes with  $\alpha$ -amylase overstitched polystyrene sorbent MN-202 could be proposed. This sorbent shows high sorption selectivity and capacity and it also possess good kinetic characteristics. Moreover, obtaining of a drug based on  $\alpha$ -amylase-MN-202 complex gives the possibility to combine the properties of enzyme drug and enterosorbent.

### References:

1. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylases from various *Bacillus* strains / S. Mitsuiki, K. Mukae, M. Sakai, M. Goto, S. Hayashida, K. Furukawa // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2005. - №37. – pp. 410-416
2. Basic Aspects of Digestion and Absorption / G. T. Wahbeh, D. L. Christie // *Pediatric Gastrointestinal and Liver Disease*. - Elsevier Inc., 2011. – pp. 10-19
3. Grigoyeva, E. P. Joint sorption immobilization of hydrolytic enzymes  $\alpha$ - amylase, *BACILLUS SUBTILIS* protease and vitamin B12 on a polymeric carrier: diss. ... PhD in biological sciences: 03.00.23 / Grigoyeva Ekaterina Pavlovna. – Saint-P., 2001. – 142 p.
4. Krasovitskaya, I. A. Study of adsorption immobilization of  $\alpha$ -amylase on various carriers / I. A. Krasovitskaya, N. V. Kotova, N. V. Glazova // *Materials of the international theoretical-practical conference «Biotechnology in complex development of regions», March 15-17, 2016*. – М.: ООО «Expo-biochim-technologii» ООО (Limited Liability Company), «RED GROUPE» ООО (Limited Liability Company), 2016. – p. 77
5. Sorption concentration of aminazine on non-ionogenic and ionogenic polymers / I. V. Shkutina [and others] // *Chemical-pharmaceutical journal*. V43, №9. – 2009. – PP. 50-52

УДК: 24.239, ББК: 28.071

## ТЕСТИРОВАНИЕ МОДУЛЕЙ НОВЫХ МОДУЛЬНЫХ НАНОТРАНСПОРТЕРОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ФРАГМЕНТА ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ NRF2 В КЛЕТКИ-МИШЕНИ

Д.И.Зрелкин, А.А.Розенкранц, А.В.Уласов, Т.А.Сластникова, Т.Н.Лупанова, А.С.Соболев

Институт биологии гена Российской академии наук, Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Россия, 119334, Москва, Вавилова, 34/5, aleza4striker@gmail.com, 89629446078

Изучены свойства четырех новых модульных нанотранспортеров (МНТ), созданных для доставки фрагмента транскрипционного фактора Nrf2 в клетки-мишени. Показано, что все МНТ способны специфически связываться с целевыми рецепторами и обладают мембранолитической активностью в нужном диапазоне pH.

**Ключевые слова:** модульные нанотранспортеры, адресная доставка лекарств, транскрипционный фактор Nrf2, дифтерийный токсин, эпидермальный фактор роста

Получены новые МНТ для направленной внутриклеточной доставки фрагмента транскрипционного фактора Nrf2 (Nrf2p), способного активировать антиоксидантную систему клетки. Адресная доставка Nrf2p может быть полезна для торможения развития нейродегенеративных заболеваний, которые вызывают гибель нейронов за счет окислительного стресса [1].

МНТ – искусственные белки, состоящие из нескольких функциональных модулей: эпидермальный фактор роста (EGF) или антитело к рецептору EGF (Ab-EGFR) – лигандный модуль; транслокационный домен дифтерийного токсина (DTox) – эндосомолитический модуль; оптимизированный сигнал ядерной локализации большого Т-антигена вируса SV-40 (NLS) – модуль доставки в ядро; гемоглобиноподобный белок E. coli (HMP) – модуль-носитель. Последовательное действие всех модулей призвано обеспечить клеточную специфичность МНТ и доставку Nrf2p в нужную часть клетки. Узнавание и проникновение МНТ в клетки-мишени обеспечивает лигандный модуль посредством специфического связывания с целевым рецептором. Вследствие этого МНТ попадает в закисляемые эндосомы, из которых он выходит в гиалоплазму за счет DTox, образующего поры в липидном бислое. Если в состав входит NLS, то МНТ транспортируется в ядро [2]. Для проведения исследования были разработаны и очищены МНТ EGF-DTox-HMP-Nrf2p, EGF-DTox-HMP-NLS-Nrf2p, (Ab-EGFR)-DTox-HMP-Nrf2p, (Ab-EGFR)-DTox-HMP-NLS-Nrf2p, в которых EGF и Ab-EGFR переставлены на N-конец молекулы, что требует проверки свойств лигандного и соседнего эндосомолитического модулей.

Цель работы – изучение функциональных свойств новых МНТ. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи: исследовать pH-зависимость мембранолитической активности МНТ; исследовать связывание МНТ с EGFR.

Мембранолитическую активность определяли по выходу флуоресцирующего красителя кальцеина из нагруженных им фосфатидилхолиновых липосом под действием МНТ. Кальцеин использовали в концентрации, при которой наблюдается концентрационное тушение флуоресценции. При выходе из липосом происходит разведение кальцеина, вследствие чего он начинает интенсивно флуоресцировать. Липосомы инкубировали с МНТ, без МНТ, а также с детергентом вместо МНТ для определения сигнала, фона и максимума флуоресценции, соответственно. Выход кальцеина наблюдался в области pH 5.5, что свидетельствует о сохранении активности DTox [3].

Сродство МНТ к рецептору определяли по конкурентному связыванию МНТ и 125I-EGF с EGFR. Были построены зависимости концентрации связанного 125I-EGF от концентрации МНТ, по которым на основании данных о связывании 125I-EGF вычисляли равновесные константы диссоциации (KD) по модели связывания двух лигандов с одним рецептором [4]. Расчеты показали, что все МНТ взаимодействуют с EGFR с KD в диапазоне 20-50 нМ.

Поскольку эти модули функционируют, то новые МНТ обладают заданными свойствами, что означает возможность их использования для доставки Nrf2p в клетки с экспрессией EGFR.

### Литература:

1. Truyen N. et al. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress // *J Biol Chem*. 2009 284(20): 13291–13295. [2] Gilyazova D.G. et al. Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters. // *Cancer Res*. 2006, 66:10534-10540. [3] Khramtsov Y.V. et al. Modular drug transporters with diphtheria toxin translocation domain form edged holes in lipid membranes. *J Control Release*. 2008, 128:241-247. [4] Рубин А. Б. Биофизика. М., изд-во МГУ, 1999 т.1, стр.265.

**Финансирование:** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-14-01304).

UDC 24.239, BBC 28.071

## FUNCTIONALITY OF THE MODULES OF NEW MODULAR NANOTRANSPORTERS FOR DELIVERY OF FRAGMENT OF TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 INTO TARGET CELLS

**D.Zrelkin, A.Rosenkranz, A.Ulasov, T.Slastnikova, T.Lupanova, A.Sobolev**

*Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Russia, 119334, Moscow, Vavilov, 34/5*

The properties of four new modular nanotransporters (MNTs) designed to deliver a fragment of the transcription factor Nrf2 into the target cells were studied. It was shown that all MNTs are able to bind to the target receptors specifically and possess membranolytic activity in the desirable pH range.

**Key words:** modular nanotransporters, targeted drug delivery, transcription factor Nrf2, diphtheria toxin, epidermal growth factor

New MNTs for directed intracellular delivery of a fragment of the transcription factor Nrf2 (Nrf2p), capable to activate the antioxidant system of a cell, were obtained. Targeted delivery of Nrf2p can be useful for retardation of the development of neurodegenerative diseases which cause neuronal death due to oxidative stress [1].

MNTs are synthetic proteins consisting of several functional modules: epidermal growth factor (EGF) or antibody to EGF receptors (Ab-EGFR) as a ligand module, translocation domain of diphtheria toxin (DTox) as an endosomolytic module, an optimized nuclear localization signal of the large SV-40 virus T-antigen (NLS) as a module for delivery to nucleus, hemoglobin-like E. coli protein (HMP) as a carrier module. The consistent effect of all modules is designed to ensure the cellular specificity of MNTs and the delivery of Nrf2p into the correct part of the cell. The ligand module provides MNTs recognition and penetration into target cells by specific binding to target receptor. As a result, MNTs localize within the acidified endosomes. DTox modules form pores in the lipid bilayer that lead to the escape of MNT from endosomes to hyaloplasm. If NLS is included in composition, then MNTs are transported into the nucleus [2]. MNT EGF-DTox-HMP-Nrf2p, EGF-DTox-HMP-NLS-Nrf2p, (Ab-EGFR)-DTox-HMP-Nrf2p, (Ab-EGFR)-DTox-HMP-NLS-Nrf2p were produced and purified for the study. Since EGF and Ab-EGFR were rearranged to the N-terminus of the molecule, it requires first of all testing of the functional properties of these ligand modules and the neighboring endosomolytic module.

The purpose of this work was to study the functional properties of new MNTs. To achieve this goal, it was necessary to solve the following problems: investigate the pH-dependence of the membranolytic activity of MNT; investigate the binding of MNT to the EGFR.

Membranolytic activity was determined by assessing MNT mediated leakage of a fluorescent dye calcein from phosphatidylcholine liposomes loaded with the dye. Calcein was loaded into liposomes to a concentration at which concentration quenching of fluorescence was observed. Upon dilution, when liposomal leakage occurs calcein begins to fluoresce intensively. Liposomes were incubated to determine the signal, background and maximum fluorescence with MNT, without MNT, and with a detergent instead of MNT, respectively. Calcein leakage was observed in the pH range of 5.5, which indicates the preservation of DTox activity [3].

The affinity of MNT for the receptor was determined by the competitive binding of MNT and 125I-EGF to EGFR. The dependence of bound 125I-EGF concentration on MNT concentration were plotted and equilibrium dissociation constants (KD) were calculated from the binding data of 125I-EGF using the binding model of two ligands with one receptor [4]. Calculations showed that all MNTs interact with EGFR with KD in the range of 20-50 nM.

Since these modules are functional, the new MNTs possess the predetermined properties, which supports their suitability to deliver Nrf2p into cells with EGFR expression.

### References:

1. Truyen N. et al. *The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress* // *J Biol Chem.* 2009 284 (20): 13291-13295. [2] Gilyazova D.G. et al. *Targeting cells by novel engineered modular transporters.* // *Cancer Res.* 2006, 66: 10534-10540. [3] Khramtsov Y.V. et al. *Modular drug transporters with diphtheria toxin translocation domain form edged holes in lipid membranes.* *J Control Release.* 2008, 128: 241-247. [4] Rubin A. B. *Biophysics. M., p. MSU, 1999 vol.1, p.265.*

**Grant:** This work was supported by the RSF (grant No. 17-14-01304).

УДК 577

## ТЕХНОЛОГИЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ БИОАНАЛИТОВ НА ПРИМЕРЕ IL-13 ПРИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

**Прохорова М.В.**

ООО «Мерк», 115054, Москва, Валовая 35, [marina.prokhorova@merckgroup.com](mailto:marina.prokhorova@merckgroup.com)

С помощью технологии подсчета единичных молекул (SMC) компании MERCK и наборов SMCxPRO получены концентрации диагностически значимых маркеров в биологических жидкостях на уровне фемтограмм, позволяющие точно определять терапевтические эффекты кандидатов медицинских препаратов.

**Ключевые слова:** Иммуноферментный анализ, мультиплексный анализ, IL-13

Сверхчувствительная технология единичного подсчета молекул SMC (Single Molecule Counting) является незаменимым инструментом в арсенале исследователя для продвижения новых биологических исследований, ускоряя открытие и разработку новых методов лечения.

Иммуноферментный анализ (ИФА) является традиционным подходом к количественному определению биомаркеров благодаря высокой специфичности и простоте использования. Однако ИФА часто не способен определить интересующий объект, если он присутствует в низких количествах, вынуждая исследователей создавать новые сложные протоколы или полностью прекращать исследования. Технология SMC дополняет традиционный метод ИФА, делая возможным обнаружение ранее не детектируемых биомаркеров, таких как белки и нуклеиновые кислоты с беспрецедентной чувствительностью и точностью на уровне фемтограмм/мл.

Дополнение классических методов ИФА на планшетах и микросферах технологией SMC позволит ученым определять и контролировать изменения диагностически значимых биомаркеров, присутствующих в крайне низких концентрациях, например, кардиотропонин I и некоторые цитокины.

Интерлейкин-13

IL-13 представляет собой цитокин Th2, участвующий в астматическом воспалении. Для борьбы с аутоиммунными заболеваниями появляются методы лечения, направленные на подавление IL-13. Однако для количественного определения IL-13 требуется более высокая чувствительность по сравнению с традиционными методами иммуноанализа или ИФА, так как уровни циркуляции этой молекулы составляют  $\leq 1$  пг / мл.

Более высокая чувствительность была достигнута с помощью технологии SMC, которая обеспечивает 140-кратное улучшение нижнего предела количественной оценки (LLOQ; пг / mL) по сравнению с традиционным методом ИФА. Моноклональные антитела против IL-13 IMA-026 и IMA-638, каждый из которых связывается с различными рецепторами IL-13, оценивали при лечении против IL-13 у пациентов с atopической астмой.

Проприетарный набор Singulex на IL-13 с нижним пределом оценки 0.07 пг/мл, против 9.8 пг/мл для ИФА, позволил определить базовый уровень значений для исследуемой когорты (n=182). В 99% случаев, как для здоровых, так и больных, точки разделения были ниже 1 пг/мл.

УДК 577

## ULTRA LOW BIOMARKER DETECTION EXEMPLIFIED BY IL-13 IN AUTOIMMUNE DISEASES

**M. Prokhorova**

LLC Merck 115054, Moscow, Valovaya 35, [marina.prokhorova@merckgroup.com](mailto:marina.prokhorova@merckgroup.com)

Using Merck's new Single Molecule Technology (SMC) and SMCxPRO assays, clinically significant biomarkers concentrations at femto- concentrations were obtained, making possible precise measurement of drug-candidates therapeutic effects.

**Key words:** EISA, multiplexing, IL-13



Ultrasensitive Single Molecule Counting (SMC) technology provides an indispensable tool in the researcher's arsenal to help move novel biology forward, fueling the discovery and development of new therapeutics.

Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) are the traditional approach to protein biomarker quantification due to target specificity and ease of operation. However, ELISA methods often fail to quantify the target of interest if present in low abundance, which leads researchers to create more complex studies to produce the data they need, change their sample matrix, or stop investigating a putative marker entirely. Addition of patented digital SMC technology to the traditional immunoassay workflow enables detection of low-abundance, previously undetectable biomarkers, such as proteins and nucleic acids, with unparalleled sensitivity and accuracy, capturing concentrations down to the femtogram/mL level.

With the addition of SMC technology to plate- and bead-based immunoassay formats, researchers and clinicians can now detect and monitor changes of established disease biomarkers that are present at extremely low levels, such as cardiac troponin I and cytokines.

#### Interleukin-13

IL-13 is a Th2 cytokine implicated in asthmatic inflammation, and anti-IL-13 therapeutics are in development to counter autoimmune diseases. However, IL-13 quantitation requires greatly improved sensitivity over traditional immunoassay or ELISA techniques, as circulating levels of this molecule are  $\leq 1$  pg/mL.

Improved assay sensitivity has been achieved using SMC technology, which offers up to a 140-fold improvement in the lower limit of quantification (LLoQ; pg/mL) over traditional ELISA methods. Anti-IL-13 monoclonal antibodies, IMA-026 and IMA-638, each of which competes with different receptors for IL-13 binding, were evaluated for anti-IL-13 treatment in patients with mild atopic stable asthma.

The Singulex proprietary IL-13 assay (LLoQ = 0.07 pg/mL), but not traditional ELISA (LLoQ = 9.8 pg/mL), enabled quantification of baseline measurements of the clinical study population (n=182). All 99th% cut-off values for healthy and asthmatic subjects at baseline were less than 1 pg/mL.

УДК 57.088.1

## ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ОМАЛИЗУМАБ И ЭКУЛИЗУМАБ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОНЦЕПЦИИ «MULTI ATTRIBUTE METHOD»

**Дегтерев М.Б.**

ООО «Международный биотехнологический центр «Генериум», Вольгинский, Россия  
601125, Владимирская область, Петушинский район, пос. Вольгинский, ул. Владимирская, д.14  
e-mail: degterev@ibcgenerium.ru

Разработан способ характеристики критических параметров качества терапевтических моноклональных антител на примере омализумаба и экулизумаба методом жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения. Показана корреляция результатов, полученных при помощи масс-спектрометрического анализа с результатами, полученными другими методами.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела, критические параметры качества, масс-спектрометрия

Характеризация структуры и физико-химических свойств терапевтических белков – это сложный многоэтапный процесс. Спектр техник, применяемых для изучения критических параметров качества белка, включает в себя несколько видов ВЭЖХ; гель-электрофорез, спектрофотометрию и другие [??]. Они относятся к методам непрямого контроля, не позволяющим детализировать и идентифицировать отличия. Перспективное решение этой проблемы – использование хромато-масс-спектрометрического анализа и стратегии «Multi Attribute Method (MAM)» [2, 3].

С использованием стратегии bottom-up и концепции MAM был разработан быстрый способ оценки следующих критических параметров качества: аминокислотной последовательности, окисления, дезаминирования, образования пироглутамовой кислоты, отщепления С-концевого лизина, гликозилирования, вариантов дисульфидных связей. Профилирование деградации позволило установить сайты модификаций изучаемых молекул и валидировать их путем отслеживания динамики изменения содержания модифицированных форм в стрессовых условиях. Была показана корреляция результатов, полученных при помощи масс-спектрометрического анализа, с результатами других методов: спектрофотометрии, ВЭЖХ, изоэлектрофокусирования.

Перечень валидированных модификаций белков представлен ниже.

<b>Омализумаб</b>		<b>Экулизумаб</b>	
Расположение	Доля, %	Расположение	Доля, %
<b>Деаминарование</b>			
Тяжелая цепь, 84	0,25±0,015	Тяжелая цепь, 316	1,39±1,351
Тяжелая цепь, 290	0,23±0,008	Тяжелая цепь, 385	0,81±0,028
Тяжелая цепь, 319	1,65±0,067	Тяжелая цепь, 390	0,85±0,191
<b>Окисление</b>			
Тяжелая цепь, 83 (M)	2,04±0,042	Легкая цепь, 4 (M)	2,44±0,099
Тяжелая цепь, 256 (M)	3,03±0,042	Тяжелая цепь, 70 (M)	1,86±0,059
		Тяжелая цепь, 253 (M)	5,20±0,051
		Тяжелая цепь, 359 (M)	3,05±0,288
<b>Образование пироглутамовой кислоты</b>			
Тяжелая цепь, 1	2,52±0,007	Тяжелая цепь, 1	100,0
<b>Отщепление С-концевого лизина</b>			
Тяжелая цепь, 451	98,41±0,098	Тяжелая цепь, 448	92,77±0,459
<b>Гликозилирование</b>			
Тяжелая цепь, 301	100,0; из них:	Тяжелая цепь, 298	100,0; из них:
G0-GN	0,7±0,10	G0-GN	0,43±0,06
Man5	4,4±0,21	Man5	2,50±0,10
G0F-GN	19,5±0,35	G0F-GN	10,69±0,22
G0	0,1±0,04	G0F	77,75±0,40
G0F	71,9±0,63	G1F	8,62±0,17
G1F	3,4±0,01	G2F	0,02±0,01
<b>Дисульфидные связи (с долей свыше 1%)</b>			
LC23-LC138*	2,28	LC23-LC23	1,03
LC23-NC265*	5,69	LC23-LC88	4,25
LC92-LC198	3,69	LC88-NC22	4,32
LC92-NC148	1,52	LC134-LC134	1,69
LC92-NC204	1,95	LC134-LC194	6,69
LC92-NC265	4,09	LC134-NC22	1,53
LC138-LC198	5,30	LC134-NC96	6,36
LC138-NC148	5,54	LC134-NC149	3,51
LC138-NC204	5,97	LC194-LC194	2,51
LC198-NC148	1,34	LC194-NC22	5,82
NC22-NC265	26,63	LC194-NC205	1,65
NC148-NC371	3,99	NC96-NC136	1,93
NC204-NC265	1,01	NC96-NC224	3,36
NC265 Свободный остаток	10,46	NC96-NC225	1,84
NC371-NC429	5,63	NC136-NC149	2,03
NC371 Свободный остаток	7,10	NC136 Свободный остаток	2,51
		NC149 Свободный остаток	1,54
		NC205-NC149	1,44
		NC205-NC205	2,04
		NC205-NC231	1,02
		NC205-NC322	1,72
		NC205-NC368	6,00
		NC205-NC426	3,77
		NC224-NC228	2,30
		NC224-NC262	2,17
		NC224-NC368	1,87
		NC228-NC231	1,28
		NC368 Свободный остаток	4,70

\*LC – легкая цепь; NC – тяжелая цепь

Методика быстрого анализа критических параметров качества белков выглядит очень перспективной для проведения глубоких исследований отдельных молекул..

Литература:

1. Szabolcs Fekete, Davy Guillaume, Pat Sandra, and Koen Sandra. *Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals*//*Anal. Chem.* №88, Vol. 1, P. 480-507.
2. Richard S Rogers et al.. *Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics*// *MAbs.* 2015 Sep-Oct; Vol. 7(5). P881–890.
3. Richard S. Rogers et al. *A View on the Importance of "Multi-Attribute Method" for Measuring Purity of Biopharmaceuticals and Improving Overall Control Strategy*// *AAPS J.* 2017 Nov 30, Vol. 20(1): P. 7.

UDC 57.088.1

## THE ANALYSIS OF OMALIZUMAB AND ECLIZUMAB MONOCLONAL ANTIBODIES WITH THE MULTI ATTRIBUTE METHOD (MAM) LIQUID CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY

**M. Degterev**

*International Biotechnology Center Generium, Volginsky, Russia  
601125, Vladimir region, Petushinsky district, Volginskiy village, Vladimirskaia str., 14  
e-mail: degterev@ibcgenerium.ru*

The method of the CQA (critical quality attributes) characterization of the therapeutical monoclonal antibodies omalizumab and eclizumab by the HPLC with high-resolution tandem mass spectrometry (MS) was developed. The correlation between MAM and other methods results was proved.

**Key words:** monoclonal antibodies, critical quality attributes (CQA), mass spectrometry.

The characterization of the structure and physico-chemical properties of the therapeutic proteins is a complex process consists of several stages. The analytical techniques using for the CQAs evaluation of these proteins includes several modes of HPLC, gel-electrophoresis, spectrophotometry and other methods [1].

The majority of these methods did not provide a comprehensive information about the observed differences and does not allow to identify and detail them. The perspective way to solve this problem is a using of the liquid chromatography-mass spectrometry analysis with the MAM strategy [2, 3].

Using a bottom-up workflow and a MAM strategy the fast method for the CQAs characterization of the monoclonal antibodies omalizumab and eclizumab was developed. The characterized properties included amino acid sequence, posttranslational modifications: oxidation of the methionine, deamidation of the asparagine, N-end pyroglutamic acid formation, C-end lysine truncation, major glycosylation forms and disulfide bonds variants.

The examination of the degradation profiles of the omalizumab and eclizumab allowed us to accurate identify the modification sites and their percentage relative to the unmodified form. The validation of these modifications was done by the applying a various stress conditions to the proteins with subsequent estimation of the modified forms amount changes.

The correlation between the results obtained by the MAM method and other methods such as spectrophotometry, HPLC and isoelectrofocusing was proved.

The validated modifications of the proteins are enlisted below.

<b>Omalizumab</b>		<b>Eculizumab</b>	
Location	Amount, %	Location	Amount, %
<b>Deamidation</b>			
Heavy Chain, 84	0,25±0,015	Heavy Chain, 316	1,39±1,351
Heavy Chain, 290	0,23±0,008	Heavy Chain, 385	0,81±0,028
Heavy Chain, 319	1,65±0,067	Heavy Chain, 390	0,85±0,191
<b>Oxidation</b>			
Heavy Chain, 83 (M)	2,04±0,042	Light Chain, 4 (M)	2,44±0,099
Heavy Chain, 256 (M)	3,03±0,042	Heavy Chain, 70 (M)	1,86±0,059
		Heavy Chain, 253 (M)	5,20±0,051
		Heavy Chain, 359 (M)	3,05±0,288
<b>N-end pyroglutamic acid formation</b>			
Heavy Chain, 1	2,52±0,007	Heavy Chain, 1	100,0
<b>C-end Lysine truncation</b>			
Heavy Chain, 451	98,41±0,098	Heavy Chain, 448	92,77±0,459
<b>Glycosylation</b>			
Heavy Chain, 301	100,0, where:	Heavy Chain, 298	100,0, where:
G0-GN	0,7±0,10	G0-GN	0,43±0,06
Man5	4,4±0,21	Man5	2,50±0,10
G0F-GN	19,5±0,35	G0F-GN	10,69±0,22
G0	0,1±0,04	G0F	77,75±0,40
G0F	71,9±0,63	G1F	8,62±0,17
G1F	3,4±0,01	G2F	0,02±0,01
<b>Disulfide bonds (with amount &gt; 1%)</b>			
LC23-LC138*	2,28	LC23-LC23	1,03
LC23-HC265*	5,69	LC23-LC88	4,25
LC92-LC198	3,69	LC88-HC22	4,32
LC92-HC148	1,52	LC134-LC134	1,69
LC92-HC204	1,95	LC134-LC194	6,69
LC92-HC265	4,09	LC134-HC22	1,53
LC138-LC198	5,30	LC134-HC96	6,36
LC138-HC148	5,54	LC134-HC149	3,51
LC138-HC204	5,97	LC194-LC194	2,51
LC198-HC148	1,34	LC194-HC22	5,82
HC22-HC265	26,63	LC194-HC205	1,65
HC148-HC371	3,99	HC96-HC136	1,93
HC204-HC265	1,01	HC96-HC224	3,36
HC265 Free end	10,46	HC96-HC225	1,84
HC371-HC429	5,63	HC136-HC149	2,03
HC371 Free end	7,10	HC136 Free end	2,51
		HC149 Free end	1,54
		HC205-HC149	1,44
		HC205-HC205	2,04
		HC205-HC231	1,02
		HC205-HC322	1,72
		HC205-HC368	6,00
		HC205-HC426	3,77
		HC224-HC228	2,30
		HC224-HC262	2,17
		HC224-HC368	1,87
		HC228-HC231	1,28
		HC368 Free end	4,70

\*LC – light chain; HC – heavy chain

The developed method is now looks very promising for the deep characterization of the target protein studies.

*References:*

1. Szabolcs Fekete, Davy Guillaume, Pat Sandra, and Koen Sandra. *Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals*// *Anal. Chem.* №88, Vol. 1, P. 480-507.
2. Richard S Rogers et al.. *Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics*// *MAbs.* 2015 Sep-Oct; Vol. 7(5). P881–890.
3. Richard S. Rogers et al. *A View on the Importance of "Multi-Attribute Method" for Measuring Purity of Biopharmaceuticals and Improving Overall Control Strategy*// *AAPS J.* 2017 Nov 30, Vol. 20(1): P. 7.

УДК 004.94.661.12

## ЦИФРОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ

**Меньшутина Н.В., Матасов А.В.**

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия,  
125047, Москва, Миусская пл., д.9  
e-mail: chemcom@muctr.ru*

Развитие цифровых технологий для фармацевтической промышленности является актуальной и перспективной задачей. Использование цифровых технологий, в том числе суперкомпьютеров и высокопроизводительных вычислений, позволит ускорить разработку новых активных веществ и форм лекарственных препаратов, обеспечит надлежащее качество продукции и позволит создать модели управления предприятием.

**Ключевые слова:** цифровые технологии, фармацевтическое предприятие, контроль качества, масштабирование, высокопроизводительные вычисления

В настоящее время актуальной задачей является развитие цифровых технологий для различных отраслей промышленности, в том числе фармацевтической (постановление правительства РФ от 28.08.2017 № 1030). Для фармацевтической промышленности цифровые технологии могут использоваться на разных этапах жизненного цикла фармацевтического препарата для решения следующих задач:

- помощь в разработке новых активных веществ и новых форм лекарственных препаратов;
- масштабирование технологии при трансфере её из лаборатории в промышленность;
- качество продукции через проектирование (Quality-by-Design);
- организация производства и управление качеством продукции (Process Analytical Technology), в том числе on-line и in-line режимах;
- оперативное обучение и переподготовка персонала с использованием сетевых технологий.

Развитие цифровых технологий для разработки новых активных веществ и новых форм лекарственных препаратов позволит значительно ускорить научные работы, минимизировать время и деньги, затрачиваемые на натурный эксперимент и на доклинические исследования. Использование суперкомпьютеров и высокопроизводительных вычислений, технологии «больших данных» помогают не только вести направленный синтез новых веществ, скрининг, но также создавать новые фармацевтические композиции, рассчитывая покомпонентный состав, концентрации, добиваться заданного времени высвобождения, например, переходя к пролонгированным или неинвазивным препаратам.

Применение цифрового проектирования оборудования и технологических схем на основе компьютерного и математического моделирования, использование систем поддержки принятия решений, информационных и интеллектуальных систем позволяет решать задачи выпуска качественной продукции (Quality-by-Design), а новые цифровые технологии контроля, автоматизации и мониторинга для предприятия, включая системы очистки воды и газовых выбросов, соответствуют выдвигаемым директивам FDA в области PAT.

Кроме этого, для больших предприятий фармацевтической промышленности важно создать модель организационных, технологических, логистических процессов с использованием облачных вычислений, обработки и анализа больших данных мониторинга.

*Литература*

1. Мишина Ю.В., Алвес С.В., Гордиенко М.Г., Гусева Е.В., Троянkin А.Ю. *Инновационные технологии и оборудо-*

вание фармацевтического производства. М.: - Издательство БИНОМ, Т. 2. 2013. С. 480.

2. Матасов А.В., Сидоркин О.В. Системы автоматизированной поддержки принятия решений в задачах химической технологии, экологии и фармацевтики. Учеб. пособие. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2011. – 168 с.

UDC 004.94.661.12

## DIGITAL TECHNOLOGIES IN PHARMACEUTICAL ENTERPRISES

**Menshutina N.V., Matasov A.V.**

*D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia, 125047, Miusskaya sq, 9  
e-mail: chemcom@muctr.ru*

The development of digital technologies for the pharmaceutical industry is an urgent and promising task. The use of digital technologies, including supercomputers and high-performance computing, will accelerate the development of new active substances and forms of drugs, ensure proper product quality and allow the creation of enterprise management models.

**Key words:** digital technology, pharmaceutical enterprise, quality control, scaling, high-performance computing

Currently, the urgent task is the development of digital technologies for various industries, including pharmaceutical (Government Decree of August 28, 217 № 1030). For the pharmaceutical industry, digital technologies can be used at different stages in the life cycle of pharmaceutical drugs to solve the following problems:

- assistance in the development of new active substances and new forms of drugs;
- scaling of the technology when transferring from the laboratory to the industry;
- quality of products through design (Quality-by-Design);
- production organization and product quality management (Process Analytical Technology), including on-line and in-line modes;
- operational training and retraining of personnel using network technologies.

The development of digital technologies for the creation of new active substances and new forms of drugs will significantly speed up scientific work, minimize the time and money spent on full-scale experiment and on preclinical research. The use of supercomputers and high-performance computing, the technology of «large data» helps not only to direct the synthesis of new substances, screening, but also to create new pharmaceutical compositions, calculating the component composition, concentrations, achieve the desired release time, for example, by switching to prolonged or non-invasive drugs.

Application of digital equipment design and technological schemes on the basis of computer and mathematical modeling, the use of decision support systems, information and intelligent systems allows to solve the problems of Quality-by-Design output, and new digital technologies of control, automation and monitoring for the enterprise, including water purification systems and gas emissions, comply with the FDA guidelines in the field of PAT.

In addition, it is important for large pharmaceutical companies to create a model of organizational, technological, logistics processes using cloud computing, processing and analysis of large monitoring data.

### Literature

1. 1. Mishina Ju.V., Alves S.V., Gordienko M.G., Guseva E.V., Trojankin A. Ju. *Innovacionnye tehnologii i oborudovanie farmacevticheskogo proizvodstva. M.: - Izdatelstvo BINOM, I. 2. 2013. P. 480.*
2. Matasov A.V., Sidorkin O.V. *Sistemy avtomatizirovannoj podderzhki prinjatija reshenij v zadachah himicheskoj tehnologii, jekologii i farmacevtiki. Ucheb. posobie. M.: RHTU im. D.I. Mendeleeva, 2011. P. 168.*

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА: НАУКА, БИЗНЕС, ГОСУДАРСТВО

## MONOCLONAL ANTIBODIES: SCIENCE, BUSINESS, GOVERNMENT

1. IN VITRO ИММУНИЗАЦИЯ КАК ЭТАП ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА ПОЛНОСТЬЮ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ АНТИТЕЛ, Солопова О.Н., Варламов Н.Е., Свешников П.Г. ....	486
IN VITRO IMMUNIZATION AS A STAGE OF OBTAINING STABLE PRODUCERS OF FULLY HUMAN FUNCTIONALLY ACTIVE ANTIBODIES, Solopova O.N., Varlamov N.E., Sveshnikov P.G. ....	487
2. АНАЛОГИ АНТИТЕЛ НА ОСНОВЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ КАРКАСНЫХ БЕЛКОВ, Петровская Л. Е., Гапизов С. Ш., Шингарова Л. Н., Крюкова Е. А., Свирщевская Е. В., Долгих Д. А. ....	488
ANTIBODY MIMETICS BASED ON ALTERNATIVE SCAFFOLD PROTEINS, Petrovskaya L.E., Gapizov S. Sh., Shingarova L.N., Kryukova E.A., Svirschevskaya E. V., Dolgikh D.A. ....	488
3. БИОЛОГИЧЕСКИЙ МИКРОЧИП – ИНСТРУМЕНТ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУНОАНАЛИЗА, Рубина А.Ю. ....	489
BIOLOGICAL MICROARRAY AS AN INSTRUMENT OF THE MULTIPLEX IMMUNOASSAY, A. Rubina ....	490
4. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОНЕНЗИНА И САХАРОЗЫ В РАМКАХ ОПТИМИЗАЦИИ ГЛИКАНОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРОДУЦЕНТА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА, Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Горожанина Е.В., Сухоженко А.В., Чеботарева А.В., Гардеева Л.Ф., Черепушкин С.А., Серегин Ю.А. ....	491
INVESTIGATION OF MONENZINE AND SUCROSE EFFICIENCY FOR GLICOSYLATION OPTIMIZATION DURING CULTIVATION OF CHO CELLS PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODY TO TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA, E.V. Voronina, N.V. Lobanova, I.R. Yakhin, E.V. Gorozhanina, A.V. Suhogenko, A.V. Chebatoreva, L.F. Gardeeva, S.A. Cherepushkin, Y.A. Seregin ....	492
5. КОНЪЮГАТЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С НАНОЧАСТИЦАМИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И ЭКСПРЕССНЫХ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ, Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. ....	493
CONJUGATES OF MONOCLONAL ANTIBODIES WITH NANOPARTICLES FOR DEVELOPMENT OF HIGH-SENSITIVE AND RAPID IMMUNODIAGNOSTIC SYSTEMS, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	494
6. МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ СИГНАЛИНГА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА, Цой Т.Д., Круглова Н.А., Бязрова М.Г., Филатов А.В. ....	495
MONOCLONAL ANTIBODIES AS A TOOL FOR STUDYING SIGNALING IN HUMAN LYMPHOCYTES, Tsoy T.D., Kruglova N.A., Biazrova M.G., Filatov A.V. ....	496
7. ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ, ПРОИЗВОДСТВА И КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, Серегин Ю.А., Лобанова Н.В., Скрыпин В.И. ....	496
PECULARITIES IN DEVELOPMENT, MANUFACTURING AND CLINICAL USE OF MONOCLONAL ANTIBODY-BASED PHARMACEUTICALS, Serygin Yu.A., Lobanova N.V., Skrypin V.I. ....	497
8. ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АКТИВАЦИЮ КОМПЛЕМЕНТА ПО АЛЬТЕРНАТИВНОМУ ПУТИ, Ищенко А.М., Трофимов А.В., Сергеева В.Е., Петров А.В., Родин С.В. ....	498
GENERATION AND PROPERTIES OF A HUMANIZED ANTIBODY THAT INHIBITS ALTERNATIVE COMPLEMENT ACTIVATION, Ischenko A.M., Trofimov A.V., Sergeeva V.E., Petrov A.V., Rodin S.V. ....	499
9. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ГАЛЕКТИНУ, МЕТОДОМ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ, Павлова Е. В. ....	500
DEVELOPMENT OF RECOMBINANT ANTIBODIES SPECIFIC TO GALECTIN-3 BY THE PHASE DISPLAY METHOD, Pavlova E. V. ....	501
10. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, Ягудин Т.А., Клячко Е.В., Чулкин А.М., Зацепин С.С., Морозкина Е.В., Беневоленский С.В., Шемчукова О.Б., Позднякова Л.П., Боков М.Н., Солопова О.Н., Свешников П.Г. ....	502

PRODUCTION OF BIFUNCTIONAL RECOMBINANT ANTIBODIES, Yagudin T.A., Klyachko E.V., Chulkin A.M., Zatsepin S.S., Morozkina E.V., Benevolensky S.V., Shemchukova O.B., Pozdnyakova L.P., Bokov M.N., Solopova O.N., Sveshnikov P.G. ....	503
11. ПРИМЕНЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ МАГНИТНЫХ КОНЪЮГАТОВ БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 В НЕИНВАЗИВНОЙ ТЕРАНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, Николаев Б.П., Марченко Я.Ю., Яковлева Л.Ю., Злобина О.В., Ищенко А.М., Шевцов М.А. ....	504
APPLICATION OF NANOSIZED MAGNETIC CONJUGATES OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 IN NONINVASIVE THERANOSTICS OF ONCOLOGICAL DISEASES, Nikolaev B.P., Marchenko Y.Yu., Yakovleva L.Yu., Zlobina O.V., Ischenko A.M., Shevtsov M.A. ....	505
12. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ В СОЗДАНИИ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ СТАБИЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, Ерошова А.В., Карп О.Э., Таранов А. И., Басовский Ю.И., Дидук С.В. ....	505
MODERN APPROACHES TO ESTABLISHING HIGH-PRODUCTIVE STABLE CELL LINES PRODUCING THERAPEUTIC ANTIBODIES, Eroshova A. V., Karp O.E., Taranov A.I., Basovsky Y.I., Diduk S. V. ....	506
13. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, Алиев Т.К., Аргентова В.В., Панина А.А., Ильина Е.Н., Ларина М.В., Топорова В.А., Балабашин Д.С., Солопова О.Н., Деметьева И.Г., Позднякова Л.П., Сергеева М.В., Штро А.А., Клотченко С.А., Долгих Д.А., Васин А.В., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. ....	507
PROSPECTS OF USING MONOCLONAL ANTIBODIES FOR THE PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF VIRAL DISEASES, Aliev T.K., Argentova V.V., Panina A.A., Ilina E.N., Larina M.V., Toporova V.A., Balabashin D.S., Solopova O.N., Dementyeva I.G., Pozdnyakova L.P., Sergeeva M.V., Shtro A.A., Klotchenko S.A., Dolgikh D.A., Vasin A.V., Sveshnikov P.G., Kirpichnikov M.P. ....	508
14. ТРИ ПОДХОДА К РАЗРАБОТКЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ: КОНТРАКТНОЕ, САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ И КОМБИНИРОВАННОЕ, В. Климович ....	509
THREE APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES: CONTRACTE, INDEPENDENT AND COMBINED, V.Klimovich ....	510
15. УДАЛЕНИЕ АГРЕГАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ НА АФФИННОМ СОРБЕНТЕ, Годованный А.В., Чеботарева А.В., Гардеева Л.Ф., Селищев С.В. ....	511
REMOVAL OF MONOCLONAL ANTIBODY AGGREGATES BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY, Godovannyi A.V., Chebotareva A.V., Gardeeva L.F., Selischev S.V. ....	512
16. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ДОТ-ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНОВ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI, Негоденко А.О., Храпова Н.П. ....	513
EFFICACY OF A DOT-ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY IN DETECTING BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ANTIGENS, Negodenko A.O., Khrapova N.P. ....	514
17. ТЕСТ СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ-МАРКЕРУ ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА: КОНСТРУИРОВАНИЕ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ, Т.В.Замарина ....	515
EXPERIMENTAL ELISA KIT BASED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST 200 KDA ANTIGEN: DESIGN AND APPLICATION EFFICIENCY, T. Zamarina ....	516



УДК 57.085.23

## IN VITRO ИММУНИЗАЦИЯ КАК ЭТАП ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА ПОЛНОСТЬЮ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНЫХ АНТИТЕЛ

Солопова О.Н., Варламов Н.Е., Свешников П.Г.

Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, Россия  
 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д.8  
 e-mail: solopova@msn.com

Получена гибридома- продуцент высокоаффинных полностью человеческих антител, нейтрализующих вирус бешенства. Показаны пути преодоления проблем со стабильностью, продуктивностью человеческих гибридом, переключением субтипов, созревaniem аффинитета антител.

**Ключевые слова:** in vitro иммунизация; человеческое антитело; гетерогибридома; цитокины.

Препараты на основе моноклональных антител прочно вошли в клиническую практику многих стран, и объем рынка терапевтических антител ежегодно растет. При долговременном приеме таких препаратов у значительной части пациентов появляются нежелательные иммунные реакции, даже когда основой препарата являются полностью человеческие антитела. Проявление иммуногенности может быть связано с тем, что при разработке человеческих антител применяют генно-инженерные методы, способные приводить к появлению иммуногенных участков (эпитопов). Адаптация традиционной гибридомной технологии к получению продуцентов человеческих антител может способствовать решению этой проблемы.

Главной сложностью при разработке человеческой гибридомы является трудность в получении антитело-продуцирующих клеток- партнера для гибридизации. У животных источником таких клеток служат лимфоузлы и селезенка, в них находятся лимфобласты на разных стадиях созревания. У человека клетки для гибридизации могут быть получены только из периферической крови, и лимфобластов там практически нет. Для получения антитело-продуцирующих клеток человека мы выделяли из периферической крови В-лимфоциты и проводили процедуру in vitro иммунизации с участием антиген- презентующих клеток и Т-хелперов. Антиген- презентующие клетки (АПК) получали из моноцитов периферической крови, для этого моноциты стимулировали цитокинами и антигеном- частицами вируса бешенства. Т-хелперы получали из CD4+лимфоцитов периферической крови. В результате воздействия АПК и Т-хелперов при участии цитокинов, отвечающих за активацию и пролиферацию В- и Т-лимфоцитов и за переключение изотипов иммуноглобулинов, получали зрелые В-лимфоциты, продуцирующие высокоаффинные антитела класса IgG. Для того, чтобы эти лимфоциты могли быть гибридизованы с опухолевой линией, их при помощи митогена трансформировали в лимфобласты.

Другая сложность при получении человеческих гибридом- их нестабильность из-за недостаточного генетического соответствия антитело-продуцирующих клеток и опухолевой линии. Эту проблему удалось решить использованием в качестве опухолевого партнера гетерогибридомы мышь- человек, утратившей антителопродукцию. Таким образом были получены клоны, стабильно продуцирующие антитела в течение нескольких месяцев непрерывного культивирования.

Среди полученных человеческих антител лучшим оказалось антитело RabD4. Оно относится к субтипу IgG1-λ, направлено к гликопротеиду G и способно нейтрализовать вирус бешенства. По аффинности антитело RabD4 превосходит антитела компании Crucell CR4098 и CR57, прошедших несколько этапов клинических испытаний, Kd антитела RabD4 составляет  $2,2 \pm 0,3$  нМ. Полученная гибридома может быть использована как самостоятельный продуцент или в качестве источника генетического материала для конструирования вектора.

Работа выполнена при поддержке субсидии Министерства образования и науки Российской Федерации RFMEFI60716X0154.

UDC 57.085.23

## IN VITRO IMMUNIZATION AS A STAGE OF OBTAINING STABLE PRODUCERS OF FULLY HUMAN FUNCTIONALLY ACTIVE ANTIBODIES

**Solopova O.N., Varlamov N.E., Sveshnikov P.G.**

*Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow, Russia  
117149, Moscow, Simpheropolskiy Blvd., 8  
e-mail: solopova@msn.com*

A hybridoma-producer of high affinity fully human antibody, neutralizing the rabies virus, was obtained. The ways of overcoming the problems with stability, productivity of human hybrids, switching of sub-types, maturation of the affinity of antibodies are shown

**Key words:** in vitro immunization; human antibody; heterohybridoma; cytokines.

Drugs based on monoclonal antibodies are widely used in clinical practice in many countries, and the volume of the therapeutic antibody market is growing annually. At long-term application of such drugs a significant part of patients develops unwanted immune reactions, even when the basis of the drug is completely human antibodies. The manifestation of immunogenicity may occur due to the fact that in the development of human antibodies there are used genetically engineered methods which can lead to the appearance of immunogenic sites (epitopes). Adaptation of traditional hybridoma technology for the production of human antibody producers can help to solve this problem.

The main difficulty in developing human hybridomas is the sophisticated procedure of obtaining antibody-producing partner cells for hybridization. In animals the source of such cells is lymph nodes and spleen, they contain lymphoblasts at different stages of maturation. In humans cells for hybridization can only be obtained from peripheral blood, and there are practically no lymphoblasts. In order to produce antibody-producing human cells we isolated B-lymphocytes from peripheral blood and performed an in vitro immunization procedure involving antigen-presenting cells and T-helper cells. Antigen-presenting cells (APC) were purified from peripheral blood monocytes, for this purpose monocytes were stimulated with cytokines and antigen (rabies virus particles). T-helpers were obtained from CD4 + peripheral blood lymphocytes. As a result of the effects of APC and T-helpers with the participation of cytokines, responsible for the activation and proliferation of B and T lymphocytes and for switching immunoglobulin isotypes, mature B lymphocytes producing high affinity antibodies of IgG class were obtained. To provide for these lymphocytes hybridization with the tumor line cells, they were transformed into lymphoblasts by a mitogen.

Another difficulty in producing human hybridomas is their instability due to insufficient genetic matching between antibody-producing cells and the tumor line cells. This problem has been solved by using a mouse-human heterohybridoma as a tumor partner, which has lost antibody production. Thus, the hybridoma clones which consistently produced antibodies during several months of continuous cultivation, were obtained.

Among the obtained human antibodies, the best antibody was RabD4. It belongs to the subisotype IgG1- $\lambda$ , it is directed to the glycoprotein G and it is capable to neutralize the rabies virus. By affinity, the RabD4 antibody is superior to the Crucell CR4098 and CR57 antibodies that have passed through several stages of clinical trials, the Kd of the RabD4 antibody is  $2.2 \pm 0.3$  nM. The resulting hybridoma can be used as a substantive producer or as a source of genetic material for the construction of the vector.

The work was supported by a grant from the Ministry of Education and Science of the Russian Federation RFMEFI60716X0154.

УДК 571.27

## АНАЛОГИ АНТИТЕЛ НА ОСНОВЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ КАРКАСНЫХ БЕЛКОВ

Петровская Л. Е., Гапизов С. Ш., Шингарова Л. Н., Крюкова Е. А., Свирцевская Е. В., Долгих Д. А.

ФГБУН Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Россия  
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10  
E-mail: lpetr65@yahoo.com

Аналоги антител на основе альтернативных каркасных белков получают все большее распространение в биомедицине и биотехнологии, что связано с легкостью их конструирования и возможностью различных модификаций. Для отбора новых вариантов связывающих белков нами разработана и оптимизирована система дисплея 10 домена фибронектина человека III типа (10Fn3) на поверхности клеток *Escherichia coli*. Получены гибридные  $\alpha\beta 3$ -интегрин-связывающие белки на основе 10Fn3 с увеличенным временем циркуляции в организме.

**Ключевые слова:** альтернативные каркасные белки; клеточный дисплей; 10Fn3; гибридные белки

Высокая аффинность и специфичность моноклональных антител является основой их широкого распространения в качестве эффективных препаратов для терапии и диагностики различных заболеваний. Однако крупные размеры и сложная структура ограничивают их применение в некоторых случаях. Получение аналогов антител на основе альтернативных каркасных белков (АКБ), таким образом, позволяет расширить сферу биомедицинского и биотехнологического использования искусственных связывающих молекул.

В соответствии со структурными особенностями АКБ делятся на несколько классов, при этом связывающая поверхность может формироваться за счет вариации петель (аднектины, аникалины) или элементов вторичной структуры (дарпины, аффибоди). 10 домен фибронектина человека III типа (10Fn3) является одним из наиболее популярных каркасных белков. Небольшой размер, высокая растворимость и исключительная термостабильность облегчают конструирование и использование искусственных связывающих белков на его основе. Объединение таких белков с другими функциональными модулями позволяет расширять сферу использования полученных терапевтических и диагностических реагентов.

Нами разработан новый класс гибридных флуоресцентных белков, содержащих mCherry и  $\alpha\beta 3$ -интегрин- или VEGFR2-связывающие белки, для визуализации маркеров неоангиогенеза на поверхности клеток. С целью увеличения времени циркуляции в организме получен ряд гибридов  $\alpha\beta 3$ -интегрин-связывающего белка с альбумин-связывающим доменом (ABD) и изучены их свойства. Для отбора новых вариантов связывающих белков разработана и оптимизирована система дисплея 10Fn3 на поверхности клеток *E. coli*.

Работа проводится при поддержке гранта РФФИ № 16-04-00717 и программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

UDC 571.27

## ANTIBODY MIMETICS BASED ON ALTERNATIVE SCAFFOLD PROTEINS

Petrovskaya L.E., Gapizov S. Sh., Shingarova L.N., Kryukova E.A., Svirschevskaya E. V., Dolgikh D.A.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
117997, Moscow, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10  
E-mail: lpetr65@yahoo.com

Antibody mimetics based on alternative scaffold proteins are becoming more common in biomedicine and biotechnology due to the ease of their construction and the possibility of various modifications. For the selection of new variants of binding proteins, we have developed and optimized a system of cell surface display of the 10th domain of human fibronectin type III (10Fn3) on the surface of *Escherichia coli* cells. We have obtained hybrid  $\alpha\beta 3$ -integrin-binding proteins based on the 10Fn3 with increased circulation time in the body.

**Key words:** alternative scaffold proteins; cell surface display; 10Fn3; hybrid proteins

10th domain of human fibronectin type III (10Fn3) is one of the most popular scaffold proteins. Its small size, high solubility and exceptional thermal stability provide the ease of construction and application of the artificial binding proteins based on this scaffold. Fusion of such proteins with other functional modules allows extending the application range of the obtained therapeutic and diagnostic reagents.

We have developed a new class of hybrid fluorescent proteins which contain the fluorescent protein mCherry and  $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin or VEGFR2-binding proteins for the imaging of cell markers of neoangiogenesis on the cell surface. To increase the circulation time in the organism, we have obtained various hybrids of  $\alpha\text{v}\beta 3$ -integrin-binding protein and the albumin-binding domain (ABD) and studied their properties. For the selection of new variants of binding proteins on the basis of 10Fn3 the bacterial display system in *E. coli* with the use of autotransporter from *Psychrobacter cryohalolentis* K5T was developed and optimized.

The work is supported by the grants from RFBR № 16-04-00717 and RAS "Molecular and Cell Biology" Program.

УДК 577.29

## БИОЛОГИЧЕСКИЙ МИКРОЧИП – ИНСТРУМЕНТ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

Рубина А.Ю.

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.  
e-mail: allarubina@hotmail.com

Биологические микрочипы на основе трехмерных гидрогелей позволяют проводить мультиплексный иммуноанализ, осуществлять выбор иммунореагентов отвечающих требованиям такого анализа и создавать иммуноаналитические тест-системы.

**Ключевые слова:** мультиплексный иммуноанализ, биологический микрочип

Развитие персонализированной медицины делает актуальным разработку молекулярно-биологических подходов, позволяющих одновременно определять большое число аналитов в одном образце. Примером такого подхода может служить мультиплексный иммуноанализ. Идеальным инструментом для проведения мультиплексного анализа являются биологические микрочипы – массивы элементов, содержащие иммобилизованные молекулярные зонды: ДНК, РНК, белки, олигосахариды или низкомолекулярные лиганды.

В ИМБ РАН разработан метод получения биологических микрочипов (биочипов) на основе трехмерных гидрогелей, позволяющий не только проводить мультиплексный анализ образца, но и решить проблему сохранения исходной биологической активности иммобилизуемых в гелевых элементах зондов белковой природы. Биочипы могут содержать ячейки с иммобилизованными индивидуальными белками, например с антителами или антигенами, либо с набором белков, как это происходит при иммобилизации полнобелковых экстрактов при создании алерго-биочипа. Находящийся в ячейке иммобилизованный лиганд, при инкубации биочипа с образцом, содержащим анализируемые соединения, образует специфический комплекс. На этой стадии происходит разделение анализируемых соединений из смеси по их способности к специфическому связыванию с иммобилизованными зондами, что позволяет проводить одновременный анализ нескольких объектов на одном биочипе.

С помощью биочипов возможно также проводить выбор пар антител удовлетворяющих основным требованиям мультиплексного анализа: высокая специфичность к каждому антигену и отсутствие перекрестной реактивности как к другим определяемым аналитам, так и к антителам против них.

Разработанный метод был апробирован на примере создания ряда иммуноаналитических систем, таких, как, система для выявления 15-ти белковых токсинов бактериального и растительного происхождения [1]; тест-система для одновременного количественного определения 9-ти серологических онкомаркеров, имеющих наиболее высокую клиническую значимость [2]. Для продолжения этой тематики был разработан биочип, содержащий 53 иммобилизованных гликана, с помощью которого для пациентов с диагнозом колоректальный рак были выявлены диагностические сигнатуры – комбинации уровней аутоантител к онкоассоциированным гликанам и концентраций значимых белковых онкомаркеров, позволяющие проводить уточняющий диагноз [3]. На основе биочипа, содержащего 45 аллергенов создана тест-система для одновременного анализа панели аллерген-специфических иммуноглобулинов классов E и G4 в образцах сывороток крови пациентов [4, 5]. Тест-система предназначена для диагностики аллергических заболеваний и контроля результативности проводимой терапии.

## Литература:

1. Rubina A.Yu., Dyukova V.I., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Nesmeyanov V.A., Grishin E.V., Zasedatelev A.S. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips // *Anal. Biochem.* 2005. Vol. 340. P. 317-329.
2. Ж. И. Зубцова, Е. Н. Савватеева, В. И. Бутвилловская, М. В. Цыбульская, В. Р. Чечёткин, Л. О. Самохина, Л. И. Винницкий, В. В. Масленников, Ю. П. Резников, А. С. Заседателев, А. Ю. Рубина. Анализ девяти серологических онкомаркеров на гидрогелевом биочипе // *Биоорганическая химия.* 2013. Т. 39. №6. С. 693–704.
3. Butvilovskaya VI, Popletaeva SB, Chechetkin VR, Zubtsova ZI, Tsybul'skaya MV, Shilova NV, Bovin NV, Zasedatelev AS, Rubina AY. Multiplex determination of serological signatures in the sera of colorectal cancer patients using hydrogel biochips // *Cancer Medicine.* 2016. doi: 10.1002/cam4.692.
4. Feyzkhanova GU, Filippova MA, Talibov VO, Dementieva EI, Maslennikov VV, Reznikov YP, Offermann N, Zasedatelev AS, Rubina AY, Fooke-Achterrath M. Development of hydrogel biochip for in-vitro allergy diagnostics // *Journal of Immunological Methods.* 2014. Vol. 406. P. 51-57.
5. Feyzkhanova G, Voloshin S, Smoldovskaya O, Arefieva A, Filippova M, Barsky V, Pavlushkina L, Butvilovskaya V, Tikhonov A, Reznikov Y, Rubina A. Development of a microarray-based method for allergen-specific IgE and IgG4 detection // *Clinical Proteomics.* 2017. doi: 10.1186/s12014-016-9136-7.

UDK 577.29

## BIOLOGICAL MICROARRAY AS AN INSTRUMENT OF THE MULTIPLEX IMMUNOASSAY

**A. Rubina**

Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, 119991, Vavilova 32, Moscow, Russia  
e-mail: allarubina@hotmail.com

Biological microchips on the basis of three-dimensional hydrogels allow carrying out multiplex immunoassay, selecting immunoreagents conforming to all the assay requirements, and developing biochip-based immunoanalytical test-systems.

**Key words:** multiplex immunoassay, biological microchip, biological microarray

The progress in personalized medicine demands development of molecular-biological approaches that allow simultaneous detection of a large number of analytes in a single sample. Multiplex immunoassay may serve as an example of such approach. Ideal instruments for carrying out multiplex immunoassay are biological microchips – arrays of elements containing immobilized molecular probes: DNA, RNA, proteins, oligosaccharides or low-molecular ligands.

EIMB RAS developed a method for the manufacturing of biological microchips (biological microarrays, biochips) on the basis of three-dimensional hydrogels. Biochips allow one not only to carry out multiplex analysis of a sample but also to solve the problem of maintaining the initial biological activity of probes of protein nature that are immobilized in gel elements. Biochips may contain elements with immobilized individual proteins, for example, antibodies or antigens, or protein mixtures as in the case of immobilization of whole-protein extracts for allegro-biochip. Upon incubation of biochip with a sample containing analyzed compounds, immobilized ligand in the biochip gel element forms specific complex. At this stage of the assay the analyzed compounds from a mixture are divided according to their ability for specific binding with immobilized probes that permits carrying out simultaneous assay of several compounds on a single biochip.

Biochips also allow one to select antibody pairs that conform to the main requirements for multiplex assay: high specificity to each antigen and absence of cross-reactivity to both analytes under study and antibodies against these analytes.

The developed method was tested by the construction of a series of immunoanalytical test-systems such as test-system for the detection of 15 protein toxins of bacterial and plant origin [1], test-system for the simultaneous quantitative determination of 9 serological tumor markers of highest clinical significance [2]. To continue this subject, biochip containing 53 immobilized glycans has been created. Using the glycan biochip, diagnostic signatures, i.e. combinations of levels of auto-antibodies to tumor-associated glycans and concentrations of relevant protein tumor markers that help to set accurate diagnosis, were revealed for the patients with colorectal cancer [3]. On the basis of biochip containing 45 allergens, test-system for the simultaneous assay of a panel of allergen-specific immunoglobulins of E and G4 classes in blood serum samples of patients was constructed [4, 5]. The test-system is intended for diagnosing of allergic diseases and control of results of conducted therapy.

References:

1. Rubina A.Yu., Dyukova V.I., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Nesmeyanov V.A., Grishin E.V., Zasedatelev A.S. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips // *Anal. Biochem.* 2005. Vol. 340. P. 317-329.
2. Zubcova Zh.I., Savvateeva E.N., Butvilovskaya V.I., Cybul'skaya M.V., Chechetkin V.R., Samokhina L.O., Vinnitskii L.I., Maslennikov V.V., Reznikov Iu.P., Zasedatelev A.S., Rubina A.Iu. Immunoassay of nine serological tumor markers on hydrogel-based microchip // *Bioorg Khim.* 2013. Vol. 39 (6). P. 693–704.
3. Butvilovskaya V.I., Popletaeva S.B., Chechetkin V.R., Zubtsova Z.I., Tsybul'skaya M.V., Shilova N.V., Bovin N.V., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y. Multiplex determination of serological signatures in the sera of colorectal cancer patients using hydrogel biochips // *Cancer Medicine.* 2016. doi: 10.1002/cam4.692.
4. Feyzkhanova G.U., Filippova M.A., Talibov V.O., Dementieva E.I., Maslennikov V.V., Reznikov Y.P., Offermann N., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y., Fooke-Acherrath M. Development of hydrogel biochip for in-vitro allergy diagnostics // *Journal of Immunological Methods.* 2014. Vol. 406. P. 51-57.
5. Feyzkhanova G., Voloshin S., Smoldovskaya O., Arefieva A., Filippova M., Barsky V., Pavlushkina L., Butvilovskaya V., Tikhonov A., Reznikov Y., Rubina A. Development of a microarray-based method for allergen-specific IgE and IgG4 detection // *Clinical Proteomics.* 2017. doi: 10.1186/s12014-016-9136-7.

УДК 615.33(076.5) (075.8)

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОНЕНЗИНА И САХАРОЗЫ В РАМКАХ ОПТИМИЗАЦИИ ГЛИКАНОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРОДУЦЕНТА МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ АЛЬФА

**Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Горожанина Е.В., Сухоженко А.В., Чеботарева А.В., Гардеева Л.Ф., Черепушкин С.А., Серегин Ю.А.**

ГНЦ РФ ФГУП НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1,  
e-mail: voronina-ek@bk.ru

Одной из важных характеристик, корректировку которой можно осуществить на этапе разработки технологии культивирования, является профиль гликозилирования, определяющий как эффекторные функции молекулы, так и ее фармакокинетику. Было показано, что уровень маннозного гликана Man 5 влияет на эффективность связывания антитела с рецептором FcγRIII (CD16a) и опосредованную антигеном клеточную цитотоксичность. В связи с этим, проведена коррекция маннозных гликанов в биосимилярном моноклональном антителе к фактору некроза опухолей альфа путем внесения ионофорного антибиотика монензина и сахарозы при культивировании клеток линии CHO.

**Ключевые слова:** гликозилирование, клетки CHO, культивирование, монензин, оптимизация, сахароза

Оценить эффективность коррекции маннозного гликана Man 5 биосимилярного моноклонального антитела путем внесения монензина и сахарозы при культивировании клеточной линии-производителя на основе суспензионных клеток CHO.

Культивирование в малом объеме осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 125 мл (Corning, США) на шейкере-CO<sub>2</sub>-инкубаторе Multitron Cell (Infors, Швейцария) с частотой вращения 125 об/мин в атмосфере 5%-ного углекислого газа при температуре 37 °C и влажности 75%. Процессы проводили в формате "fed-batch" в среде Dynamis (Gibco, США) с периодическим добавлением комплексной подпитки Cell Boost 7a/b (HyClone/PAА, США). В ходе экспериментов в колбы с культурой клеток вносили добавки – монензин и сахарозу (оба реагента Sigma-Aldrich, США). Выделение антитела из культуральной жидкости проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке с сорбентом MabSelect SuRe LX (GE Healthcare, США). Концентрацию в элюате определяли спектрофотометрическим методом. Дегликозилирование антител осуществляли ферментом N-гликозидазой F (Roche, Швейцария) при температуре 37 °C в течение 18 ч. Анализ гликанов осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии.

Исследования влияния ионофорного антибиотика монензина на уровень содержания гликана Man5 при засевах колб (на 0 сутки) до конечной концентрации от 5 до 60 нМ показали, что его добавление до 10 нМ хорошо переносится культурой клеток, однако было недостаточным для повышения содержания гликана Man5 в сравнении с оригинальным препаратом. Внесение 20 нМ монензина оказалось наиболее

эффективным для достижения желаемого эффекта, однако повлияло на ростовые характеристики и продуктивность. В связи с этим, был проведён эксперимент по подбору его оптимальной схемы внесения 20 нМ в культуральную среду, что подтвердило целесообразность применения ионофорного антибиотика в для коррекции содержания гликана Man5 в рамках изменчивости оригинального антитела, но с некоторыми потерями по общей продуктивности.

В результате изучения влияния сахарозы на уровень маннозного гликана в диапазоне концентраций от 10 до 150 мМ, было показано, что ее внесение в концентрации от 10 до 20 мМ оказывало слабый эффект на содержание гликана, однако начиная с 30 мМ, детектировалось заметное возрастание процентного содержания формы Man5. Оптимальный результат был зафиксирован в пробе с 60 мМ сахарозы, где наблюдалось близкое значение к содержанию этого типа гликана в оригинальном препарате, а так же сохранение ростовых характеристик и продуктивности по сравнению с контролем без внесения сахарозы. Повышение концентрации более 60 мМ негативно отражалось на ростовых характеристиках, а в конечном счете, и на продуктивности клеточной линии, однако при этом удавалось существенно увеличить долю маннозного гликана в 2-3 раза. Наряду с этим, подтверждена эффективность связывания с рецептором FcγRIII (CD16a) и опосредованная антигеном клеточная цитотоксичность биосимильного антитела, полученного в эксперименте с добавлением 60 мМ сахарозы, в сравнении с оригинальным препаратом методом иммуноферментного анализа.

Проведена коррекция маннозных гликанов в биосимильном рекомбинантном моноклональном антителе к фактору некроза опухолей альфа при культивировании клеточной линии CHO. Показана эффективность ионофорного антибиотика монензина в концентрации 20 нМ для повышения доли высокоманнозной гликоформы Man5, что сочеталось с ухудшением роста и продуктивностью клеточной линии. Подтверждено, что содержание гликоформы Man5 в профиле гликозилирования биосимильного моноклонального антитела может быть приведено в соответствие с содержанием гликозилированных форм в оригинальном препарате путем внесения сахарозы в концентрации 60 мМ, как наиболее предпочтительного агента, который позволяет сохранить культуральные характеристики и продуктивность клеточной линии.

UDC 615.33(076.5) (075.8)

## INVESTIGATION OF MONENZINE AND SUCROSE EFFICIENCY FOR GLYCOSYLATION OPTIMIZATION DURING CULTIVATION OF CHO CELLS PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODY TO TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA

**E.V. Voronina, N.V. Lobanova, I.R. Yakhin, E.V. Gorozhanina, A.V. Suhogenko, A.V. Chebatoreva, L.F. Gardeeva, S.A. Cherepushkin, Y.A. Seregin**

*Scientific Centre RF, Institute of genetics and selection of industrial microorganisms, Russia, Moscow, 1st Dorozhny proezd, 1, mail: voronina@pharmapark.ru*

The safety and efficacy of therapeutic monoclonal antibodies produced by mammalian cells depends on post-translational modification, in particularly, on glycosylation. The glycosylation profile plays a critical role in determining the therapeutic profile of glycoproteins and is one of the important characteristics, which can be corrected within framework of development cultivation technology. It was shown the mannose glycan Man 5 level has a major impact on FcγRIII (CD16a receptor) binding affinity of the biosimilar monoclonal antibody and antigen-mediated cellular cytotoxicity (ADCC). Thereby the glycan with five mannose residues (Man5) of a biosimilar monoclonal antibody to the tumor necrosis factor alpha was modulated via addition ionophore antibiotic monensin and sucrose.

**Key words:** glycosylation, CHO cells, optimization, cultivation, sucrose

Assess the correction efficacy for mannose glycan Man 5 of the biosimilar monoclonal antibody via addition ionophore antibiotic monensin and sucrose within framework of cultivation of CHO cells.

Cell line were cultured in 125 ml Erlenmeyer flasks (Corning, USA) using a CO<sub>2</sub> Multitron Cell shaker-incubator (Infors HT, Switzerland) operating at a speed of 125 rpm in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, at a temperature of 37°C and 95% humidity. The processes were carried out as fed-batch of Dynamis medium (Gibco, USA) supplemented with the complex feed Cell Boost 7a / b (Hyclone / PAA, USA). Monensin and sucrose were added during the cultivation (both reagents Sigma-Aldrich, USA). The antibody was affinity purified on MabSelect SuRe LX (GE Healthcare, США). Glycan profile was analyzed by HILIC-LC-MS after treatment by N-glycosidase.

The investigation of ionophore antibiotic monensin efficiency in order to increase Man5 level supplemented (on

day 0) to a final concentration ranged from 5 to 60 nM was performed. The addition of 10 nM to the culture media allowed to maintain cell growth and productivity after all, but was insufficient to increase Man5 level in compared with the original monoclonal antibody. The addition of 20 nM monensin turned out more effective to achieve a suitable level, but caused a minor toxic effect. Due to optimization a scheme for supplementing of 20 nM monensin to the culture medium the advisability of ionophore antibiotic to correct Man5 level was confirmed, but with some losses in the overall cell line productivity.

As a result of the study as for sucrose efficiency within range from 10 to 150 mM, the supplementation of 10-20 mM had a weak impact on the Man5 level. Meanwhile starting from 30 mM, a noticeable increase in the percentage of Man5 level was detected. The positive results were observed in a sample with supplementation of 60 mM sucrose, where the Man5 glycan level in the original antibody was close to the biosimilar one, also growth characteristics and productivity were maintained in comparison with the control without sucrose. It was noticed that supplementation sucrose of more than 60 mM negatively impacted on the growth characteristics, and ultimately, the productivity of the cell line, but it was possible to significantly increase Man 5 level up to 2-3 times.

Moreover, the binding efficiency of the biosimilar antibody to the FcγRIII receptor (CD16a) and antigen-mediated cellular cytotoxicity were confirmed in the studies with supplementation of 60 mM sucrose in comparison with the original antibody via ELISA.

The correction of mannose glycans level for biosimilar monoclonal antibody to the tumor necrosis factor alpha during the cultivation of CHO cells was carried out. The supplementation effectiveness of 20 nM ionophore antibiotic monensin to increase Man5 level was shown, along with a deterioration cell growth and productivity. It was confirmed that Man5 glycan level of the biosimilar monoclonal antibody can be increased by supplementation of 60 mM sucrose as the most preferred agent without significant negative impact on productivity or cell growth.

УДК 57.083.3

## КОНЪЮГАТЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ С НАНОЧАСТИЦАМИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И ЭКСПРЕССНЫХ ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

**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, стр. 2  
e-mail: zherdev@inbi.ras.ru*

Рассмотрено влияние характеристик моноклональных антител и их конъюгатов в наночастицами на пределы детекции иммуноаналитических методов с их использованием. Представлены примеры управления чувствительностью и специфичностью в иммунохроматографическом и иммуноферментном анализе антибиотиков, микотоксинов, белковых биомаркеров.

**Ключевые слова:** антитела, иммуноанализ, наночастицы, коллоидное золото, аффинность иммунореагентов, высокочувствительные аналитические системы

Антитела и их комплексы с маркерами и носителями являются ключевым элементом иммуноаналитических систем, широко используемых для решения разнообразных диагностических задач. Доклад посвящен рассмотрению требований, которые предъявляются к таким реагентам различными форматами иммуноанализа, а также способам получения наиболее эффективных реагентов для высокочувствительной и достоверной диагностики. Анализируемые закономерности рассматриваются на примерах разработанных тест-систем для детекции антибиотиков, микотоксинов, белковых биомаркеров.

Обсуждаются особенности антител, определяющие их преимущества по сравнению с альтернативными рецепторными молекулами. На основании разработанных математических описаний иммуноаналитических систем обосновываются требования к свойствам иммунореагентов, оптимальных для высокочувствительной детекции. Характеризуются отличия факторов, лимитирующих предел детекции конкурентных и неконкурентных форматов анализа, особенности использования нативных антител и их моновалентных производных. Показано влияние состава конъюгатов гаптен-белок на предел детекции конкурентного иммуноанализа. Обсуждаются требования к специфичности, предъявляемые при иммунодетекции структурно близких соединений разных классов. На примерах иммуноферментного и иммунохроматографического анализа антибиотиков разных классов характеризуются способы управления спец-



ифичностью иммунного распознавания в аналитических системах.

На примерах конъюгатов антител с нанодисперсными носителями (золотые наночастицы, частицы магнетита, квантовые точки) анализируется влияние состава и способа получения конъюгатов на их функциональные характеристики. Описываются разработанные способы оценки состава конъюгатов и их реакционной способности; анализируются концентрационные зависимости иммобилизации, условия, при которых формируются моно- и полислойные покрытия. Показано, что при стандартной адсорбционной иммобилизации антител на золотых наночастицах их антиген-связывающая способность снижается в 8-25 раз (в зависимости от аналита). Рассмотрены варианты с непрямой иммобилизацией антител на наночастицах. На примерах детекции микотоксинов показаны преимущества этого подхода для конкурентного иммуноанализа (выигрыш в чувствительности от 10 до 50 раз). Охарактеризовано повышение стабильности иммобилизованных на наночастицах антител по отношению к денатурирующему действию органических растворителей – экстрагентов гидрофобных аналитов. Сочетания из нескольких видов функционализированных наночастиц характеризуются как средства усиления сигнала в иммунных тестах. На примере стрептомицина рассмотрены условия, при которых агрегация наночастиц в ходе иммунохроматографии приводит к снижению предела детекции на два порядка.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-16-00149).

UDC 57.083.3

## CONJUGATES OF MONOCLONAL ANTIBODIES WITH NANOPARTICLES FOR DEVELOPMENT OF HIGH-SENSITIVE AND RAPID IMMUNODIAGNOSTIC SYSTEMS

Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamental Foundations of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
119071, Moscow, Leninsky prospect, 33, building 2  
e-mail: zherdev@inbi.ras.ru*

The influence of the parameters of monoclonal antibodies and their conjugates in nanoparticles on the limits of detection of immunoanalytical methods with their use is considered. Examples of sensitivity and specificity operation in immunochromatographic and immunoenzyme analysis of antibiotics, mycotoxins, protein biomarkers are presented.

**Key words:** antibodies, immunoassay, nanoparticles, colloidal gold, affinity of immunoreagents, highly sensitive analytical systems

Antibodies and their complexes with markers and carriers are a key element of immunoanalytical systems that are widely used for a variety of diagnostic tasks. The report is focused on consideration of the requirements imposed on such reagents by different formats of immunoassay, as well as ways of obtaining the most effective reagents for highly sensitive and reliable diagnostics. Analyzed regularities are considered using examples of the developed test systems for the detection of antibiotics, mycotoxins, protein biomarkers.

Features of antibodies that determine their advantages in comparison with alternative receptor molecules are discussed. Based on the developed mathematical descriptions of immunoassay systems, the requirements for the properties of immunoreagents optimal for high-sensitive detection are substantiated. Differences in the factors limiting the detection limit of competitive and non-competitive formats of analysis are characterized, features of these of native antibodies and their monovalent derivatives in these assay formats. The influence of the composition of hapten-protein conjugates on the detection limit of competitive immunoassays is shown. Requirements to specificity of immunodetection for structurally close compounds of different classes are discussed. Using examples of immunoenzyme and immunochromatographic analysis of antibiotics of different classes, the approaches to modulate the specificity of immune recognition in analytical systems are considered.

On examples of conjugates between antibodies and nanodispersed carriers (gold nanoparticles, magnetite particles, quantum dots) the influence of the composition and the method of the conjugates obtaining on their functional characteristics is analyzed. The developed methods for estimating the composition of conjugates and their reactivity are described. The concentration dependences of immobilization are analyzed, as well as the conditions under which mono- and poly-layer coatings are formed. It has been shown that with the standard adsorption immobilization of antibodies on gold nanoparticles their antigen binding capacity decreases by

8-25 times (depending on the analyte). Variants with indirect immobilization of antibodies on nanoparticles are considered. The examples of mycotoxins detection show the advantages of the given approach for competitive immunoassay (gain in sensitivity from 10 to 50 times). An increase in the stability of antibodies immobilized on nanoparticles with respect to the denaturing influence of organic solvents, extractants of hydrophobic analytes, is characterized. Combinations of several types of functionalized nanoparticles are characterized as means of signal amplification in immune tests. Example of streptomycin demonstrates the conditions under which the aggregation of nanoparticles during immunochromatography leads to a reduction of detection limit by two orders of magnitude.

The work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 14-16-00149).

УДК 612.017.1

## МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА КАК ИНСТРУМЕНТ ИЗУЧЕНИЯ СИГНАЛИНГА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Цой Т.Д., Круглова Н.А., Бязрова М.Г., Филатов А.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия  
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 24  
e-mail. avfilat@yandex.ru

Связывание лигандов с поверхностными рецепторами приводит к запуску сигнала активации лимфоцитов. Сигналинг сопровождается последовательным фосфорилированием/дефосфорилированием киназ и адаптерных белков. Определение путей проведения сигнала в решающей степени зависит от возможностей получения фосфоспецифических моноклональных антител.

**Ключевые слова:** лимфоциты человека, поверхностные антигены, активация клеток.

Моноклональные антитела сыграли решающую роль в расшифровке антигенного портрета лимфоцитов человека. Со временем из чисто научного инструмента они превратились в ценные диагностические реагенты, которые с успехом используются при выявлении иммунопатологических и онкологических состояний. Последние годы ознаменовались переходом моноклональных антител в разряд иммунотерапевтических препаратов. Наряду с этим продолжается поиск новых антител, которые обнаруживают неизвестные ранее поверхностные рецепторы, а также распознают различные протеоформы уже известных антигенов. К настоящему времени в нашей лаборатории получено более полусотни антител к различным рецепторам лимфоцитов человека. Эта работа ведется в тесной международной кооперации в рамках Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop. На последний 10-й Воркшоп нами были представлены уникальные антитела против поверхностного маркера Т- и В-лимфоцитов - лимфоцитарного фосфатаза-ассоциированного фосфопротеина (LPAP). Этот белок рассматривался как кандидат на включение в CD номенклатуру. LPAP входит в состав антиген-специфического рецепторного комплекса и, вероятно, принимает участие в передаче сигнала от рецептора. Нами были определены 4 сайта фосфорилирования молекулы LPAP, статус фосфорилирования которых зависел от состояния активации лимфоцитов. Были синтезированы фосфопептиды, соответствующие фрагментам белка LPAP. При иммунизации мышей конъюгатами фосфопептидов с BSA были получены моноклональные антитела, реагирующие с фосфорилированным LPAP и не связывающиеся с дефосфорилированным белком. Нами были получены антитела против LPAP, фосфорилированного по Ser-99 и Ser-153 сайтам. Полученные фосфоспецифические антитела реагировали в тестах Вестерн блота и иммунопреципитации. Использование полученных фосфоспецифических антител позволит определить участие молекулы LPAP в процессах активации Т- и В-лимфоцитов. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 17-04-00526.

UDC 612.017.1

## MONOCLONAL ANTIBODIES AS A TOOL FOR STUDYING SIGNALING IN HUMAN LYMPHOCYTES

Tsoy T.D., Kruglova N.A., Biazrova M.G., Filatov A.V.

National Research Center - Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation  
115478, Russia Federation, Moscow, Kashirskoe shosse 24.  
e-mail. avfilat@yandex.ru

Ligand binding to lymphocyte surface receptors leads to triggering of the activation signaling cascade. This cascade is accompanied by sequential phosphorylation/dephosphorylation events of kinases and adapter proteins. The determination of signaling pathways critically depends on the availability of phosphospecific monoclonal antibodies.

**Key words:** lymphocyte, monoclonal antibodies, antigenic

Monoclonal antibodies played a decisive role in deciphering the antigenic portrait of human lymphocytes. Over time, from a purely scientific instrument, they have turned into valuable diagnostic reagents, which are successfully used in the diagnosis of immunopathological and oncological states. The last years were marked by the transition of monoclonal antibodies to the category of immunotherapeutic agents. Along with this, the search continues for new antibodies that detect previously unknown surface receptors and also recognize different proteoforms of already discovered antigens. To date, more than fifty antibodies to various receptors of human lymphocytes have been generated in our laboratory. This work was conducted in close international cooperation with the Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop. On the last 10th Workshop, we presented unique antibodies against Lymphocyte Phosphatase-Associated Phosphoprotein (LPAP), which is expressed on the surface of T- and B-lymphocytes. This protein was considered as a candidate for inclusion in the CD nomenclature. LPAP is a part of the antigen specific receptor complex and is likely to be involved in signaling from this receptor. We identified 4 sites of LPAP phosphorylation, which phosphorylation status depended on the state of lymphocyte activation. Phosphopeptides corresponding to fragments of the LPAP protein were synthesized. Following immunization of mice with conjugates of phosphopeptide with BSA, monoclonal antibodies against LPAP phosphorylated Ser-99 or Ser-153 were generated. These antibodies reacted in Western blot and immunoprecipitation. The use of phosphospecific antibodies will allow us to determine the role of LPAP in the activation of T and B lymphocytes. This work was supported by the RFBR grant 17-04-00526.

УДК 602.6:615

## ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ, ПРОИЗВОДСТВА И КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Серегин Ю.А., Лобанова Н.В., Скрыпин В.И.

Общество с ограниченной ответственностью "Фармапарк", Москва, Россия  
117246, Москва, Научный проезд, д.8, стр.1  
e-mail: yuriy.seregin@pharmapark.ru

В докладе будут суммированы собственные и литературные данные по разработке моноклональных антител, их свойствам, современным способам производства с использованием генно-модифицированных клеточных линий, а также по их медицинскому применению.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела; клетки млекопитающих; культивирование; очистка; контроль качества.

Применение препаратов на основе рекомбинантных моноклональных антител (pMAT) неуклонно растёт во всем мире – каждый год на мировом рынке появляется несколько десятков препаратов pMAT для терапии онкологических, аутоиммунных, инфекционных и ряда других заболеваний. Абсолютное большинство pMAT получают в клетках яичников китайского хомячка (CHO), которые хорошо охарактеризованы, способны расти

в виде суспензии в бессывороточных питательных средах, и при этом обеспечивают профиль посттрансляционных модификаций, схожий с человеческим.

Поскольку для клинического применения требуются большие дозировки препаратов, содержащих rMAT, разрабатываемые технологии должны отличаться высоким уровнем выхода целевого продукта. В настоящее время типичный уровень продуктивности клеток CHO – 2-5 г/л. Это обеспечивается использованием высокопроизводительных стабильных клеточных линий, получаемых при трансфекции клеток генетическими конструкциями, которые содержат сильные промоторы, элементы регуляции экспрессии (MAR-элементы и др.), а также системы амплификации, позволяющие увеличить количество копий целевого гена. Не менее важным этапом разработки процесса является оптимизация культивирования клеток, заключающаяся в подборе среды и подпитки для культивирования, а также выборе физико-химических параметров. На этапе разработки культивирования можно значительным образом смоделировать качество производимого белка, в первую очередь, профиль гликозилирования, который критически важен для эффекторных функций антител и для их фармакокинетических показателей.

В отличие от культивирования технологии очистки rMAT достаточно хорошо проработаны и позволяют достичь 70-80% выхода целевого продукта при почти полном удалении родственных примесей и остатков клеточных веществ. Основное направление разработки технологий очистки – достижение высоких параметров качества и чистоты препаратов rMAT, позволяющих избежать побочных эффектов при клиническом применении.

В качестве отдельной задачи следует выделить разработку состава готовой лекарственной формы. Ее сложность состоит в том, что терапия антителами требует высоких дозировок – 40-400 мг/дозу. Наиболее удобным вариантом являются преднаполненные шприцы, содержащие антитела в концентрации 50-200 мг/мл, при которых трудно добиться стабильности препарата. Поэтому часто используются инфузионные формы введения, для которых лиофилизированное или концентрированное антитело разводят буфером и вводят пациентам капельно.

Поскольку антитела – крайне дорогие препараты, предлагаются различные решения, направленные на снижение их дозировок: повышение аффинности к антигенам, усиление эффекторных функций с помощью гликомоделирования, создание комплексов с токсинами. В целом, накопленный опыт индустрии в области получения rMAT позволяет успешно решать технологические проблемы. Более сложными задачами отрасли являются поиск новых мишеней, более аффинных антител на имеющиеся мишени, снижение дозировок и себестоимости производства. Решение этих задач позволит расширить покрытие групп больных современными препаратами и снизить нагрузку на бюджет здравоохранения.

UDC 602.6:615

## PECULIARITIES IN DEVELOPMENT, MANUFACTURING AND CLINICAL USE OF MONOCLONAL ANTIBODY-BASED PHARMACEUTICALS

Serygin Yu.A., Lobanova N.V., Skrypin V.I.

Pharmapark LLC, Moscow, Russia  
117245 Moscow, Nauchny proezd build. 8/ 1  
e-mail: yuriy.seregin@pharmapark.ru

This work summarizes our own and literature data on development of monoclonal antibody-based pharmaceuticals, their properties, methods of production with genetically engineered cell lines and clinical use.

**Key words:** monoclonal antibodies; cell culture; upstream; downstream; quality control.

Application of recombinant monoclonal antibodies (rMAB) based drugs is constantly raising all over the world with the launching of several new pharmaceuticals each year for treatment of oncological, autoimmune, infectious and other diseases. The majority of rMAB are being produced in Chinese hamster ovary cells (CHO), which are well characterized, can grow in suspension in serum-free media and provide a wide spectrum of human-like posttranslational modifications.

Due to high dosage of rMAB preparations for clinical use, manufacturing processes should be highly productive. The typical productivity level for CHO cells is about 2-5 g/L. It can be achieved with the use of high-productive and stable cell lines, generated by transfection with plasmids containing high promoters, expression regulation elements (MAR-elements etc.), as well as amplification regions for increasing copies of the gene of interest.

Cell culture optimization is an important step of process development, it usually includes the adjustment of optimal medium-feed combination and physicochemical parameters of the process. Upstream development could

be used for improving of rMAB quality, including glycosylation profile, which is critical for MAB effector functions and pharmacokinetics.

In contrast to upstream process, downstream is better investigated with a typical 70-80% yield of rMAB, free of related and host-cell impurities. The main line of downstream development is obtaining of product high quality and purity, which allow to diminish side effects of pharmaceuticals during clinical use.

Formulation should also be considered as an important step of product development process. The main challenge is high dose of rMAB pharmaceuticals – usually 40-400 ng/dose for therapy are applied. Pre-filled syringes are the most convenient variant, however they contain concentrations of rMAB reaching 50-200 mg/mL, which requires stability confirmation. That is why infusion formulations, where lyophilized or concentrated antibody is previously reconstituted and then injected to patient, are widely used.

As rMAB are rather expensive, different solutions for decreasing of their doses are possible: enhancement of affinity to antigen, glycane modification for increase of effector functions, formation of complexes with toxins. In the whole, the current world experience of rMAB manufacturing allows to resolve the most of technological problems. Nevertheless, search for new targets and stronger antibodies to available targets, as well as decrease of dosage and reduction of production cost are still challenging. Solution of these problems will provide more patients with state-of-the-art drugs and reduce costs for health-care system.

УДК 616-097.3

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ГУМАНИЗИРОВАННОГО АНТИТЕЛА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АКТИВАЦИЮ КОМПЛЕМЕНТА ПО АЛЬТЕРНАТИВНОМУ ПУТИ

Ищенко А.М., Трофимов А.В., Сергеева В.Е., Петров А.В., 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: ischenko@hpb-spb.com

Получено рекомбинантное гуманизированное антитело к неопредетерминанте С3 компонента комплемента, нейтрализующее активацию комплемента по альтернативному пути в соотношении к С3 как 1:64. Показано, что сайт связывания антитела локализован на С3с домене молекулы С3.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела; гуманизированное антитело; альтернативный путь активации комплемента; С3, С3а, С5а белки комплемента; нейтрализующая активность.

Моноклональные антитела (МАТ), способные влиять на функциональную активность комплемента, представляют в настоящее время повышенный интерес для фармакологов и биотехнологов, разрабатывающих новые лекарственные средства коррекции активации системы комплемента.

Показано, что при нарушении регуляторного звена комплемента происходит его усиленная активация, что приводит к развитию патологического воспаления. Мишенями для блокирования классического, альтернативного или лектинового путей активации комплемента (КПК, АПК и ЛПК) могут быть такие ключевые компоненты и факторы, как С1q, С3, С5, В, D, а также анафилатоксины С3а и С5а – продукты активации любого из путей. Нейтрализация этих белков системы комплемента прерывает цепь активации и предотвращает генерацию анафилатоксинов и других биологически активных продуктов активации.

Целью настоящей работы было получение МАТ, нейтрализующих АПК на стадии формирования С3 конвертаза.

Для реализации этой цели был выбран подход, при котором в качестве антигена для иммунизации была использована смесь интермедиатов комплемента, образующаяся после инкубации сыворотки крови человека с известным активатором АПК зимозаном, а скрининг выполнялся по ингибированию активации АП. В результате исследования была отобрана гибридома, продуцирующая МАТ, эффективно блокирующие активацию комплемента по АП, определены нуклеотидные последовательности генов легкой и тяжелой цепей отобранного моноклонального антитела, создан штамм-продуцент рекомбинантного антитела мыши. Далее, следуя технологии гуманизации антител методом «CDR-grafting», были сконструированы синтетические последовательности ДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи гуманизированного антитела к С3 компоненту комплемента, векторные плазмиды, и получен новый штамм клеток CHO-humC34 – продуцент рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 (1).

Рекомбинантный белок hC34 был получен путем суспензионного культивирования клеток штамма-продуцента в бессывороточной среде и хроматографически очищен из культуральной жидкости до гомогенного состояния.

Показано, что антитело hC34 распознает конформационную детерминанту молекулы C3, которая образуется в результате каскада биохимических реакций активации комплемента и, как следствие, конформационных преобразований, но не связывается с нативной молекулой C3. Особенность полученного антитела заключается в том, что с его помощью избирательно блокируется только АПК и не затрагиваются два других пути (1,2), причем нейтрализующий эффект достигается при существенном молярном недостатке антитела по отношению к C3 (1:32 – 1:64).

Методами иммуносорбции, электрофореза и иммунохимического анализа показано, что антитело hC34 взаимодействует с детерминантой, локализуемой на конформерах C3(H2O), C3i, C3b и на  $\alpha$ 2-фрагменте C3c, характеризующемся молекулярной массой 39 кДа.

Литература:

1. Патент РФ №2630647/26, 11.09.2017

2. Сергеева В.Е., Трофимов А.В., Жахов А.В., Родин С.В., Ищенко А.М. Моноклональные антитела для регуляции системы комплемента человека // Иммунология. - 2016. - Т.1. - С.9-13.

UDC 616-097.3

## GENERATION AND PROPERTIES OF A HUMANIZED ANTIBODY THAT INHIBITS ALTERNATIVE COMPLEMENT ACTIVATION

**Ischenko A.M., Trofimov A.V., Sergeeva V.E., Petrov A.V., Rodin S.V.**

*Federal State Unitary Enterprise "State Research Institute of Highly Pure Biopreparations", Federal Medical and Biological Agency, Saint Petersburg, Russia  
197110, Pudozhskaya ul., 7, Saint Petersburg  
E-mail: ischenko@hpb-spb.com*

A recombinant humanized complement C3 neodeterminant antibody was generated and was demonstrated to inhibit alternative complement activation in the ratio 1:64 in regard to C3. The antibody binding site was shown to be localized on the C3c domain of C3 molecule.

**Key words:** monoclonal antibodies, humanized antibody, alternative complement pathway, complement C3, C3a, C5a proteins, neutralizing activity

At the present time monoclonal antibodies capable of regulating complement functional activities are of increased interest for pharmacologists and biotechnologists as the candidates for developing antibody-based therapeutics.

If not properly regulated, the activated complement appears to contribute to the development of pathological inflammatory conditions. The key complement proteins and factors, such as C1q, C3, C5, B, and D, as well as C3a and C5a anaphylatoxins – the complement split products would be potential targets to block classical, alternative, or lectin complement activation. Neutralization of these proteins can interrupt the activation path and thus prevent generation of anaphylatoxins and of other biologically active molecules.

The present study was aimed at generation of monoclonal antibodies that can inhibit alternative complement activation at the stage of formation of C3 convertase.

Mice were immunized with a mixture of complement intermediate products released as a result of human serum activation were screened for the capacity to inhibit alternative complement activation and those, generating monoclonal antibodies able to effectively block alternative complement activation, were selected. The nucleotide sequences of genes encoding the light and heavy chains of the antibody were identified. The strain producing the recombinant mouse antibody was developed. Further, according to antibody "humanization" technology, using "CDR-grafting method, the DNA sequences, encoding the light and heavy chains of the anti-C3 humanized antibody and the vector plasmids were constructed. As a result, a new CHO-humC34 strain producing the recombinant humanized hC34 antibody was developed (1).

The recombinant hC34 protein was produced by cultivating the cells in serum-free medium and was purified to homogeneity from culture supernatants by chromatography techniques.

The produced hC34 antibody was found to recognize the conformation determinant in C3 molecule, formed as a result of complement activation and subjected to conformation changes, but not to bind to native C3 molecule. The special feature of the hC34 antibody was that it can selectively block only alternative complement activation,

not influencing the two other activation pathways (1,2). What is more, the antibody neutralizing effect was achieved at a significant molar antibody deficiency (1:32 – 1:64) in regard to C3.

By data of immunoabsorption assay, immunoassay, and electrophoresis technique, the hC34 antibody was demonstrated to recognize the determinant on C3(H2O), C3i, and C3b conformers and on the a'2-fragment of C3c of 39 kD molecular mass.

#### References

1. Patent RU №2630647/26, 11.09.2017
2. Sergeeva V.E., Trofimov A.V., Zhakhov A.V., Rodin S.V., Ischenko A.M. Monoclonal antibodies for regulation of human complement system // *Immunologia*. - 2016.-Vol.1.- P:9-13.

УДК 577.2.04

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ГАЛЕКТИНУ-3, МЕТОДОМ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ

Павлова Е. В.

Антерикс, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская. 7, 142290.  
e-mail: Catarios-KSU@mail.ru

С помощью селекций методом фагового дисплея впервые получены человеческие рекомбинантные моноклональные кросс-реактивные антитела, специфичные к галектину-3 человека и макаки. Новые антитела могут быть использованы для таких методов исследования, как иммуноферментный анализ, вестерн-блоттинг, и проточная цитометрия.

**Ключевые слова:** галектин-3, антитела, фаговый дисплей.

Галектин-3 (Гал-3) белок, с молекулярной массой 26 кДа, способный связывать галактозиды. В норме, галектин-3 присутствует в эпителиальной ткани, а также экспрессируется в клетках иммунной системы, принимающих участие в воспалении. Гал-3 вовлечен в развитие различных патологий, таких как рак, хроническая сердечная недостаточность, и фиброз. Известно, что повышение уровня Гал-3 в периферической крови людей, страдающих онкологическими заболеваниями, увеличивает риск возникновения метастаз [1]. Кроме того, галектин-3 опосредованная активация макрофагов приводит к избыточной экспрессии коллагена в тканях. В норме, это необходимо для заживления ран, но в ситуации хронической воспалительной реакции, избыточная продукция коллагена макрофагами, приводит к фибротизации воспаленной ткани. Ингибирование фибротизации возможно при добавлении специфических ингибиторов галектина-3 [2]. В настоящий момент, в клинической практике нет неинвазивного, чувствительного и высокоспецифичного метода диагностики фиброза и метастатического потенциала опухоли. Использование специфических антител к галектину-3 является одним из быстрых методов точной диагностики хронического фиброза и опухолей.

Целью работы было получение кросс-реактивных рекомбинантных человеческих антител к галектину-3 человека и макаки.

Методом фагового дисплея из синтетических человеческих библиотек было получено шесть антител к Гал-3. Было проведено три раунда селекций с чередованием антигена человека и макаки для получения кросс-реактивных молекул. Полноразмерные антитела нарабатывали в суспензионной культуре клеток СНО-1 с использованием бесывороточных сред. Таким образом, наш продукт лишен примесей (вирусы, прионы), которые могут содержаться в препаратах, полученных гибридным или асцитным методами.

Аффинность антител составила от 0,12 до 33нМ. Наличие в полученных антителах сэндвич-пары позволяет определять концентрацию галектина-3 в растворе методом иммуноферментного анализа (ИФА). Также, для двух из шести антител показана возможность использования их для таких методов, как проточная цитометрия и вестерн-блот.

Новые рекомбинантные моноклональные антитела к галектину-3 обладают необходимыми свойствами для создания диагностической тест-системы, и широкими возможностями для использования в научно-исследовательской деятельности.

**Благодарности:** Работа выполнена при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в рамках программы УМНИК (договор №0032932).

## Литература:

1. Shekhar M.P., Nangia-Makker P., Tait L., Miller F., Raz A. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial–endothelial interactions// *Am. J. Pathol.* 165 (2004) 1931–1941.
2. Traber P. Chou H., Zomer E., Hong F., Klyosov K., Frel M., Friedman S.L. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease// *Plos One* (2013) 778–789.

UDC 577.2.04

## DEVELOPMENT OF RECOMBINANT ANTIBODIES SPECIFIC TO GALECTIN-3 BY THE PHASE DISPLAY METHOD

**Pavlova E. V.**Anterix, Moscow region, Pushchino, 7 Institutskaya str., 142290. e-mail: [Catarios-KSU@mail.ru](mailto:Catarios-KSU@mail.ru)

The recombinant monoclonal human antibodies specific for human and macacca galectins-3 were obtained by the phage display method. New antibodies can be used for such research methods as ELISA, western blot, and flow cytometry.

**Key words:** galectin-3, antibodies, phage display.

Galectin-3 (Gal-3) is 26 kDa galactoside-binding protein. Normally, galectin-3 is present in the epithelial tissue and also expressed in the immune system cells that participate in inflammation. Gal-3 is involved in various pathologies, such as cancer, heart failure and fibrosis. Rise of Gal-3 level in cancer patients, is known, increases the risk of metastasis [1].

Macrophages activation by galectin-3 results in excessive expression of collagen in tissues. Normally, it is necessary for wound healing, but in case of chronic inflammation it leads to fibrosis in inflamed tissue. Inhibition of fibrosis is possible with the addition of specific inhibitors of galectin-3 [2].

At present there is no non-invasive, sensitive and highly specific method for diagnosis of fibrosis and metastatic tumor potential. The use of Gal-3 specific antibodies is the one of the fast and accurate ways for the diagnostics of chronic fibrosis and tumors.

The purpose of this study was development of cross-reactive recombinant human antibodies to human and macacca galectins-3.

Six antibodies to gal-3 were obtained by the phage display method with the use of human synthetic libraries. Three rounds of selection with human and macacca antigens alternating were carried out for the production of cross-reactive molecules. Full-length antibodies were expressed in a suspension culture of CHO-1 cells using serum-free media. Thus, our product is free of impurities (viruses, prions) which can be contained in preparations obtained by hybridoma or ascites methods.

Affinity of antibodies is from 0,12 to 33 nM. The presence of the sandwich-pair in obtained antibodies allows determining the concentration of galectin-3 in the solution by the method of enzyme immunoassay (ELISA). Also, for two of six antibodies, the possibility of using them for methods such as flow cytometry and western blot has been demonstrated.

Recombinant antibodies specific to Gal-3 have the properties necessary for the creation of diagnostic test system and extensive opportunities for the use in research activities.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Fund for Assistance to Small Innovate Enterprises (Contract No. 0032932, UMNİK).

## References:

1. Shekhar M.P., Nangia-Makker P., Tait L., Miller F., Raz A. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial–endothelial interactions// *Am. J. Pathol.* 165 (2004) 1931–1941.
2. Traber P. Chou H., Zomer E., Hong F., Klyosov K., Frel M., Friedman S.L. Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease// *Plos One* (2013) 778–789.



УДК 576.809.7:616.988.21:663.12/14

## ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

**Ягудин Т.А., Клячко Е.В., Чулкин А.М., Зацепин С.С., Морозкина Е.В., Беневоленский С.В., Шемчукова О.Б., Позднякова Л.П., Боков М.Н., Солопова О.Н., Свешников П.Г.**

*Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Российской академии наук, Москва, Россия  
119071, Россия, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2  
e-mail: timyagudin@gmail.com*

В дрожжевой системе экспрессии на основе дрожжей *Pichia pastoris* получены биспецифические фрагменты антител против интерферона альфа и кадгерина 17.

**Ключевые слова:** рак желудка, биспецифические антитела, *Pichia pastoris*.

Биспецифические антитела содержат два антигенсвязывающих домена в одной молекуле. Биспецифические антитела используются для доставки цитотоксических агентов к злокачественным клеткам и являются передовым средством иммунотерапии.

*In vitro* биспецифические полноразмерные антитела или их F(ab')<sub>2</sub> фрагменты получают химической сшивкой или восстановлением с последующим селективным повторным окислением антител с разной специфичностью. Такой подход не даёт возможности получить препараты надлежащего качества в достаточном количестве для клинических исследований.

*In vivo* биспецифические антитела получают путём экспрессии генов лёгкой и тяжёлой цепей антител с разной специфичностью в одной клетке. Первым способом получения таких клеток является слияние двух гибридом, продуцирующих антитела с разной специфичностью, с образованием квадromы, продуцирующей биспецифическое антитело. С помощью генно-инженерных технологий биспецифические антитела получают и в других системах экспрессии. Например, гетерологичная система экспрессии на основе митотрофных дрожжей *Pichia pastoris* успешно применяется для получения Fab и scFv фрагментов антител.

Общей проблемой получения биспецифических антител *in vitro* и *in vivo* является правильное спаривание тяжёлых цепей. При *in vivo* продукции существует проблема правильного спаривания лёгких цепей. Существуют технологии для решения этих проблем, такие как KiH и другие. Альтернативным подходом является получение молекул, в которых антигенсвязывающие домены соединены гибким связывающим полипептидом.

В нашей лаборатории с помощью дрожжевой системы экспрессии были получены гуманизированный F(ab')<sub>2</sub> фрагмент против вируса бешенства и биспецифический Fab-scFv фрагмент против вируса бешенства и F1 капсульного белка *Y.pestis*. Эта же система была использована для получения биспецифического антитела. В качестве мишени для биспецифического антитела был выбран кадгерин 17, наиболее специфичный для опухолей ЖКТ белок. В качестве эффекторного агента был выбран интерферон альфа, так как он является стандартным препаратом при терапии целого ряда опухолей. Биспецифическое антитело против кадгерина 17 и интерферона альфа должно доставлять к опухоли интерферон альфа в виде иммунного комплекса антитела и интерферона альфа.

Первым был получен Fab-scFv фрагмент, состоящий из Fab фрагмента против кадгерина 17 связанного с scFv против интерферона альфа. Было подобрано оптимальное расположение scFv на лёгкой цепи Fab-фрагмента. Однако константа связывания с интерфероном альфа оказалась существенно ниже константы связывания полноразмерного антитела против интерферона альфа.

Проблема спаривания тяжёлых цепей была решена путём добавления лейциновых зипперов *fos* и *jun* к C-концам тяжёлых цепей Fab'-фрагментов против интерферона альфа и кадгерина 17. В результате биспецифический F(ab')<sub>2</sub> фрагмент против интерферона альфа и кадгерина 17 был собран *in vitro* из F(ab'-*fos*)<sub>2</sub> фрагмента против кадгерина 17 и F(ab'-*jun*)<sub>2</sub> фрагмента против интерферона альфа. Получение биспецифического антитела *in vitro* затруднено на этапе получения мономера F(ab'-*jun*) против интерферона альфа.

Проблема спаривания лёгких цепей была решена с использованием общей лёгкой цепи против интерферона альфа. В результате биспецифический F(ab')<sub>2</sub> фрагмент против интерферона альфа и кадгерина 17 был получен *in vivo*. Константы связывания полученного F(ab')<sub>2</sub> фрагмента с интерфероном альфа и кадгеринном 17 сравнимы с константами связывания соответствующих полноразмерных антител, что позволяет рассматривать данный белок в качестве кандидата для дальнейших доклинических исследований.

## Литература:

1. Ягудин Т.А., Клячко Е.В., Зацепин С.С., Морозкина Е.В., Беневоленский С.В., Шемчукова О.Б., Позднякова Л.П., Солопова О.Н., Свешников П.Г. Продукция гуманизованного F(ab')<sub>2</sub> фрагмента антитела против вируса бешенства в дрожжах *Pichia pastoris* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2016. — Т. 52, №. 4. — С. 370-376.

UDC 576.809.7:616.988.21:663.12/14

## PRODUCTION OF BIFUNCTIONAL RECOMBINANT ANTIBODIES

**Yagudin T.A., Klyachko E.V., Chulkin A.M., Zatsepin S.S., Morozkina E.V., Benevolensky S.V., Shemchukova O.B., Pozdnyakova L.P., Bokov M.N., Solopova O.N., Sveshnikov P.G.**

*Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences»*

119071, Russia, Moscow, Leninsky prospect, 33, build. 2.

e-mail: [timyagudin@gmail.com](mailto:timyagudin@gmail.com)

In the yeast expression system based on the yeast *Pichia pastoris*, bispecific antibodies fragments against interferon alpha and cadherin 17 were produced.

**Key words:** stomach cancer, bispecific antibodies, *Pichia pastoris*.

Bispecific antibodies combine two antigen binding domains in one molecule. Bispecific antibodies are used to deliver cytotoxic agents to malignant cells and are an advanced immunotherapy agent.

In vitro bispecific full-length antibodies or their F(ab')<sub>2</sub> fragments are produced by chemical cross-linking or reduction followed by selective re-oxidation of antibodies with different specificity. Such approach does not provide an opportunity to produce antibodies of adequate quality in sufficient quantities for clinical trials.

In vivo, bispecific antibodies are produced by expression of light and heavy chain genes of antibodies with different specificities in one cell. The first method for obtaining such cells is the fusion of two hybridomas producing antibodies with different specificities to form producing bispecific antibody quadroma. With the help of genetic engineering technologies, bispecific antibodies are also produced in other expression systems. For example, heterologous expression system based on methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been successfully used to produce Fab and scFv antibody fragments.

The common problem of producing bispecific antibodies in vitro and in vivo is the proper pairing of heavy chains. In vivo, there is a problem of proper pairing of light chains. There are technologies for solving these problems, such as KiH and others. An alternative approach is to produce molecules in which antigen-binding domains are linked by a flexible linker polypeptide.

In our laboratory humanized F(ab')<sub>2</sub> fragment against rabies virus and bispecific Fab-scFv fragment against rabies virus and F1 capsular antigen of *Y. pestis* were produced in yeast expression system [1]. The same system was used to produce bispecific antibody. The most specific protein for GI tumors cadherin 17 was chosen as the target for the bispecific antibody. Interferon alpha was chosen as the effector agent, as it is the standard drug for the therapy of a number of tumors. Bispecific antibody against cadherin 17 and interferon alpha should deliver interferon alpha to the tumor as immune complex of the antibody and interferon alpha.

First, Fab-scFv fragment consisting of Fab fragment against cadherin 17 linked to scFv against interferon alpha was produced. The optimal arrangement of scFv on the light chain of the Fab fragment was chosen. However, interferon alpha binding constant was significantly lower than binding constant of the full-length anti-interferon alpha antibody.

Heavy chains pairing problem was solved by adding leucine zippers fos and jun to the C-ends of heavy chains of Fab'-fragments against interferon alpha and cadherin 17. As a result, bispecific F(ab')<sub>2</sub> fragment against interferon alpha and cadherin 17 was assembled in vitro from F(ab'-fos)<sub>2</sub> fragment against cadherin 17 and F(ab'-jun)<sub>2</sub> fragment against interferon alpha. Production of bispecific antibody in vitro is limited at the stage of monomer F(ab'-jun) against interferon alpha production.

Light chains pairing problem was solved by using common light chain against interferon alpha. As a result, bispecific F(ab')<sub>2</sub> fragment against interferon alpha and cadherin 17 was made in vivo. The interferon alpha and cadherin 17 binding constants of resulting F(ab')<sub>2</sub> fragment are comparable to the binding constants of corresponding full-length antibodies, which allows the protein to be considered as a candidate for further preclinical trials.

## References:

1. Yagudin T.A., Klyachko E.V., Zatsepin S.S., Morozkina E.V., Benevolensky S.V., Shemchukova O.B., Pozdnyakova L.P., Solopova O.N., Sveshnikov P.G. Production of humanized F(ab')<sub>2</sub> fragment of rabies blocking antibodies in *Pichia pastoris* yeast // *Applied Biochemistry and Microbiology* 2016. Vol. 52. № 4. P. 378–383.

УДК 576.54

## ПРИМЕНЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ МАГНИТНЫХ КОНЪЮГАТОВ БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА 70 В НЕИНВАЗИВНОЙ ТЕРАНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Николаев Б.П., Марченко Я.Ю., Яковлева Л.Ю., Злобина О.В., Ищенко А.М., Шевцов М.А.

ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России, 197110, Россия, СПб, Пудожская ул. 7;

\*Институт цитологии РАН, 194064, СПб, Тихорецкий пр. 4.

e-mail: nikolaevhpb@gmail.com; shevtsov-max@mail.ru

Результаты тераностики глиомы крысы с помощью магнитных конъюгатов белка теплового шока Hsp70 с суперпарамагнитными наночастицами оксида железа

**Ключевые слова:** глиома, белок теплового шока, Hsp70, SPIONs, наночастица

Злокачественные новообразования сопровождаются появлением опухолевых антигенов на мембранах раковых клеток (Srivastava P.K., 2009). С помощью биолигандов, способных избирательно взаимодействовать с опухолевыми маркерами или концентрироваться в области опухоли, можно усилить контрастирующее действие магнитных наночастиц путем синтеза соответствующих конъюгатов. Белок Hsp70 усиленно вырабатывается организмом при стрессе и онкогенезе, предпочтительно связывается на мембранах с рецептором CD40 и способен образовывать конъюгаты с полисахаридами (Becker T., 2002). Ковалентное присоединение белка Hsp70 к магнитным наночастицам оксида железа позволяет неинвазивно проследить за адресным поступлением белка в опухоль и его участием в процессе онкогенеза в качестве индуктора иммунного ответа (Guzhova I., 2001; Ekimova I.V., 2010). Методом генной инженерии получен рекомбинатный белок теплового шока человека Hsp70. Синтезирован и охарактеризован магнитный конъюгат белка Hsp70 с наночастицами магнетита. Методом нелинейного магнитного отклика установлено и изучено суперпарамагнитное состояние магнитного шаперона. Методом МРТ и электронной микроскопии показано, что магнитный конъюгат Hsp70 проникает в злокачественные клетки глиомы С6 в процессе эндоцитоза с последующим образованием комплексов с антигенными детерминантами раковых клеток. Противоопухолевый эффект зависит от бесперебойной работы шаперона и его обеспечения необходимыми субстратами, кошаперонами и ионами (Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) в клеточной среде. В модели интракраниальной глиомы С6 у крыс было показано, что введение магнитного конъюгата белка Hsp70 приводило к замедлению прогрессии опухоли и увеличению выживаемости животных за счёт активации противоопухолевого иммунного ответа. Выяснение механизма функционирования Hsp70 в составе наноразмерного магнитного конъюгата в условиях адекватного окружению раковых клеток, и построение соответствующей модели имеет большое значение для разработки оптимальной схемы тераностики опухолей головного мозга.

УДК 576.54

## APPLICATION OF NANOSIZED MAGNETIC CONJUGATES OF HEAT SHOCK PROTEIN 70 IN NONINVASIVE THERANOSTICS OF ONCOLOGICAL DISEASES

Nikolaev B.P., Marchenko Y.Yu., Yakovleva L.Yu., Zlobina O.V., Ischenko A.M., Shevtsov M.A.

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations FMBA of Russia, 19710, Russia, St. Petersburg, Pudozhskaya

7; \*Institute of Cytology of RAS, 194064, St-Petersburg, Tikhoretsky Ave. 4.

e-mail: nikolaevhpb@gmail.com; shevtsov-max@mail.ru

Results of rat model glioma theranostic study obtained by application of conjugated heat shock protein Hsp70 with superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

**Key words:** glioma, heat shock protein, Hsp70, SPIONs, nanoparticle

Malignant tumors are often accompanied by the expression of tumor antigens on the membranes of cancer cells (Srivastava PK 2009). Application of bioligands (e.g., antibodies, Fab-fragments, peptides, etc) selectively targeting tumor markers or accumulating in the tumor area could enhance the contrast imaging effect of magnetic nanoparticles. 70-kDa heat shock protein (Hsp70) is overexpressed under stress conditions and during oncogenesis. Hsp70, preferably binds to the CD40 receptor on the surface membrane and is capable of forming conjugates with polysaccharides (Becker T., 2002). The covalent attachment of the Hsp70 protein to superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Hsp70-SPIONs) allows one non-invasive tracking of the protein into the tumor tissue thus elucidating its role in the oncogenesis and anti-cancer immunity (Guzhova I. 2001; Ekimova IV 2010). Recombinant human heat shock protein Hsp70 was obtained by genetic engineering methods. The magnetic conjugate of protein Hsp70 with nanoparticles was synthesized and characterized by biochemical and physical methods. Highly sensitive method of nonlinear magnetic response was employed for the assessment of the superparamagnetic state of Hsp70 conjugates. In vitro studies demonstrated the intracellular accumulation Hsp70-SPIONs in C6 glioma cells (via the endocytosis pathway) with subsequent formation of complexes with antigenic peptides. The anti-tumor effect of the Hsp70 was highly dependent, co-chaperones and ions ( $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ). In vivo studies in the orthotopic C6 glioma model showed the therapeutic effect of the Hsp70-SPIONs in activating the anti-tumor immune response that resulted in the increased survival of animals and delay in tumor progression. Taken together the study demonstrates that magnetic nanocarriers such as SPIONs coated with Hsp70 can be applied as a platform for boosting anti-cancer immune responses.

УДК 602-027.236

## СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ В СОЗДАНИИ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ СТАБИЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

Ерошова А.В., Карп О.Э., Таранов А. И., Басовский Ю.И., Дидук С.В.

ЗАО «Биокад», 198515, г. Санкт-Петербург, п. Стрельна, ул. Связи 34, лит. А, Россия.  
E-mail: Eroshova.av@biocad.ru

В данной работе нами были использованы различные подходы по увеличению стабильности экспрессии целевых молекул у клеточных линий, продуцирующих терапевтические моноклональные антитела. Описанные методы позволили продлить время культивирования линий-продуцентов до трех раз с сохранением выходов по целевому белку.

**Ключевые слова:** стабильные клеточные линии (СКЛ), продуктивность, клональность, вирусная система экспрессии.

Одной из проблем медицинской биотехнологии является создание клеточных линий, экспрессирующих целевой белок надлежащего качества на стабильно высоком уровне в течение длительного времени культивирования. Проблема снижения экспрессии антител имеет несколько причин, одна из которых - поликлональность культуры. Решением данной проблемы может служить дополнительное реклонирование исходной клеточной популяции.

Другой причиной снижения титров антител в ходе культивирования является генетическая нестабильность. У большинства исследуемых клонов-продуцентов, полученных в результате случайной интеграции плазмидных векторов в клеточный геном, снижение титров антител к 40 поколениям достигало 80 %. Проведенные исследования копийности и относительного уровня экспрессии генов МАТ в данных клонах выявили положительную корреляцию между количеством копий целевого гена и продуктивностью культуры. Это позволило нам установить, что падение титров обусловлено потерей копий гена интереса в ряду клеточных делений. Увеличение периода селекции культуры в ходе всего получения стабильных пулов и клонов линий-продуцентов способствует сохранению копийности генов целевых конструкций, интегрированных в геном клетки-реципиента, что, в свою очередь, позволяет увеличить время культивирования с сохранением выходов по целевому белку.

Альтернативным способом получения высоких и стабильных титров МАТ может служить использование ретровирусной системы экспрессии (РСЭ) для получения клеточных линий-продуцентов. [Kawabe et al., 2016]. Исследования клональных линий, полученных методом ретровирусной трансдукции, выявили

высокую стабильность экспрессии целевых белков у получаемых клеточных культур. Анализ титров мАТ, в том числе и сложно экспрессируемых, полученных с помощью РСЭ, показал, что снижение продуктивности линий не превысило 30 % на протяжении 100 клеточных генераций. При этом анализ копийности генов интереса (ГИ) подтвердил более высокую стабильность интеграции векторных конструкций в геном клетки-реципиента.

Таким образом, в ходе проведенных исследований, мы определили возможные пути решения проблемы нестабильной экспрессии терапевтических мАТ у клеточных линий-продуцентов, что позволяет масштабировать биотехнологические процессы до промышленного производства рекомбинантных белков.

Литература:

1. Poulain A., Perret S., Malenfant F., Mullick A., Massie B., Durocher Y. Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. // *J Biotechnol.* 2017 Aug 10; 255:16-27
2. Kawabe Y., Shimomura T., Huang S., Imanishi S., Ito A., Kamihira M. Targeted transgene insertion into the CHO cell genome using Cre recombinase-incorporating integrase-defective retroviral vectors. // *Biotechnol Bioeng.* 2016 Jul; 113(7):1600-10

UDC 602-027.236

## MODERN APPROACHES TO ESTABLISHING HIGH-PRODUCTIVE STABLE CELL LINES PRODUCING THERAPEUTIC ANTIBODIES

Eroshova A. V., Karp O.E., Taranov A.I., Basovsky Y.I., Diduk S. V.

BIOCAD JSC, 198515, 34, Let.A, Svyazi st., Village of Strelna, Saint-Petersburg, Russian Federation  
Eroshova.av@biocad.ru

In this study we used different approaches to enhance expression stability of the target molecules in the cell lines producing therapeutic monoclonal antibodies. These methods allowed us to 3-fold extend the cultivation period of the producer cell lines without losing the yield of the target protein.

**Key words:** stable cell lines (SCLs), productivity, clonality, viral expression system

One of the challenges in medical biotechnology is generating of cell lines expressing proper quality target protein at consistently high levels during a long-term cultivation. The problem of the decreasing antibody expression has several causes, one of which is a polyclonality of the cell culture. Additional sub-cloning procedure of the cell population might be the solution to this problem.

Another reason for the decreasing in antibody titers during cultivation is genetic instability. In most of the producer clones obtained by the random plasmid integration into the cell genome, the antibody titers decreased by 80% by the 40th cell generation. Analysis of the number of copies and relative mAb gene expression levels in the resulting clones revealed a positive correlation between the number of copies of the gene of interest (GOI) and the cell line productivity. It suggested that the antibody production decreases because the target gene copies are lost over the series of cell divisions. Extending the period of culture selection throughout the entire process of obtaining stable pools and clones of the producer cell lines allows maintaining the number of copies of the target gene constructions integrated into the recipient cell genome. This, in turn, allows for prolonging the culture time keeping the target protein yield stable.

An alternative way to produce high and stable mAb titers is to use retroviral expression systems (RES) for obtaining producer cell lines. [Kawabe et al., 2016]. Studies with the clonal lines created by retroviral transduction showed that the resulting cell cultures express sustainably high levels of target proteins. Analysis of mAb titers, including those of "difficult-to-express" proteins, showed that the cell line productivity decreased by not more than 30% throughout 100 cell generations. At the same time, analysis of the GOI copy numbers confirmed the improved integration stability of the vector constructs into the recipient cell genome.

In our study we have identified possible solutions to the problem of the therapeutic mAb expression instability in the producer cell lines. Our approach permits scaling up biotechnology processes to the level of industrial production of recombinant proteins.

References:

1. Poulain A., Perret S., Malenfant F., Mullick A., Massie B., Durocher Y. Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. // *J Biotechnol.* 2017 Aug 10; 255:16-27
2. Kawabe Y., Shimomura T., Huang S., Imanishi S., Ito A., Kamihira M. Targeted transgene insertion into the CHO

cell genome using Cre recombinase-incorporating integrase-defective retroviral vectors. // *Biotechnol Bioeng.* 2016 Jul;113(7):1600-10

УДК 57.083.3 571.21

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Алиев Т.К. <sup>1</sup>, Аргентова В.В. <sup>1</sup>, Панина А.А. <sup>2</sup>, Ильина Е.Н. <sup>1</sup>, Ларина М.В. <sup>2</sup>, Топорова В.А. <sup>2</sup>, Балабашин Д.С. <sup>2</sup>, Солопова О.Н. <sup>3</sup>, Дементьева И.Г. <sup>3</sup>, Позднякова Л.П. <sup>3</sup>, Сергеева М.В. <sup>4</sup>, Штро А.А. <sup>4</sup>, Клотченко С.А. <sup>4</sup>, Долгих Д.А. <sup>1,2</sup>, Васин А.В. <sup>4</sup>, Свешников П.Г. <sup>3</sup>, Кирпичников М.П. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

<sup>3</sup> Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва, Россия

<sup>4</sup> Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия  
119991, Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11  
e-mail: ta12345@list.ru

Рассмотрены основные тенденции создания противовирусных препаратов на основе моноклональных антител. Приводятся результаты исследований широкоспецифичного антитела IgA-изотипа для профилактики и лечения гриппа. Представлены результаты разработки комбинаций моноклональных антител против гликопротеина вируса Эбола, а также для постэкспозиционной профилактики заболевания бешенством.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела, вирус гриппа А, вирус бешенства, вирус Эбола, постэкспозиционная профилактика, иммуноглобулин А

Пассивная иммунизация с применением рекомбинантных моноклональных антител представляет собой эффективный способ профилактики и лечения вирусных заболеваний. За последние годы наблюдается возросшая исследовательская активность в отношении поиска моноклональных антител с высоким терапевтическим потенциалом. Причиной этому являются как периодически возникающие новые угрозы (эпидемия геморрагической лихорадки Эбола в Западной Африке в 2014-15 гг., вспышка лихорадки Зика и др.), так и необходимость борьбы с такими заболеваниями, как грипп, бешенство, лихорадка Денге, ежегодно сопровождающимися значительной летальностью и экономическим ущербом. Новые технологии, в первую очередь, В-клеточного клонирования, позволили обнаруживать уникальные вируснейтрализующие антитела, узнающие консервативные эпитопы вирусных белков, что дало мощный стимул для разработки терапевтических антител широкой специфичности и новых вакцин.

Представлены результаты разработки и исследования рекомбинантных моноклональных антител для профилактики и лечения вируса гриппа А, геморрагической лихорадки Эбола, постэкспозиционной профилактики заболевания бешенством. На примере антитела F16, широкоспецифичного к гемагглютиниnam гриппа А 16 подтипов, продемонстрирована возможность создания рекомбинантного антитела IgA-изотипа для активации мукозального иммунитета. Получены мономерные и димерные формы иммуноглобулинов A1- и A2m1-изотипов, проведено сравнение их биохимических и вируснейтрализующих свойств, на летальной мышиной модели подтверждена эффективность профилактического действия.

С целью создания иммунотерапевтического препарата получены 3 новых рекомбинантных моноклональных антитела к гликопротеину вируса Эбола. Исследована эпитопная специфичность полученных рекомбинантных антител с использованием коммерческих нейтрализующих антител к вирусному гликопротеину. Показано, что полученные рекомбинантные антитела узнают эпитопы гликопротеина, совпадающие или перекрывающиеся с эпитопами трех хорошо исследованных нейтрализующих антител против вируса Эбола.

В результате проведения исследований, направленных на получение вируснейтрализующих рекомбинантных моноклональных антител к гликопротеину вируса бешенства, отобраны гуманизированное и полностью человеческое антитело, комбинация которых может стать основой средства постэкспозиционной профилактики бешенства и способствовать замене используемого в настоящее время поликлонального сывороточного иммуноглобулина.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проекты RFMEFI60714X0060, RFMEFI60714X0096, RFMEFI60716X0154).

UDC 57.083.3 571.21

## PROSPECTS OF USING MONOCLONAL ANTIBODIES FOR THE PROPHYLAXIS AND TREATMENT OF VIRAL DISEASES

Aliev T.K. <sup>1</sup>, Argentova V.V. <sup>1</sup>, Panina A.A. <sup>2</sup>, Ilina E.N. <sup>1</sup>, Larina M.V. <sup>2</sup>, Toporova V.A. <sup>2</sup>, Balabashin D.S. <sup>2</sup>, Solopova O.N. <sup>3</sup>, Demytyeva I.G. <sup>3</sup>, Pozdnyakova L.P. <sup>3</sup>, Sergeeva M.V. <sup>4</sup>, Shtro A.A. <sup>4</sup>, Klotchenko S.A. <sup>4</sup>, Dolgikh D.A. <sup>1,2</sup>, Vasin A.V. <sup>4</sup>, Sveshnikov P.G. <sup>3</sup>, Kirpichnikov M.P. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Research Institute of Influenza, Saint-Petersburg, Russia

119991, Moscow, Lenin Hills, 1, bldg. 11

e-mail: ta12345@list.ru

The main trends in the development of antiviral therapies based on monoclonal antibodies are discussed. The experimental results are given of the study of a recombinant broadly specific monoclonal antibody of IgA isotype for the prophylaxis and treatment of influenza. The development of monoclonal antibody cocktails to the Ebola virus glycoprotein, as well as for the post-exposure prophylaxis of rabies is described.

**Key words:** monoclonal antibodies, influenza A virus, rabies virus, Ebola virus, post-exposure prophylaxis, immunoglobulin A

Passive immunization using recombinant monoclonal antibodies is an efficient method for the prophylaxis and treatment of viral diseases. In recent years, there is a rising research activity for the search of monoclonal antibodies with high therapeutic potential. It is caused by periodically arising new challenges (Ebola hemorrhagic fever epidemics in Western Africa in 2014-2015, Zika fever outbreak, etc.), as well as the demand to combat such diseases as influenza, rabies, Dengue fever, characterized by significant annual mortality rate and economic burden. New technologies such as B cell cloning helped to identify unique virus neutralizing antibodies recognizing conservative epitopes of viral proteins, giving a boost to the development of broadly neutralizing therapeutic antibodies and novel vaccines.

In this report we present the case studies of the development of recombinant monoclonal antibodies for the prophylaxis and treatment of flu caused by influenza A virus, Ebola virus hemorrhagic fever, as well as for the post-exposure prophylaxis of rabies. On the example of the FI6 antibody, broadly specific to 16 subtypes of influenza A virus, we demonstrated the possibility to develop a recombinant antibody of IgA isotype for the activation of mucosal immunity. Immunoglobulin monomeric and dimeric forms of IgA1- and IgA2m1-isotypes were obtained, its biochemical and virus neutralizing properties were compared, the prophylactic effect was confirmed using a lethal mouse model.

For the development of an immunotherapeutic drug, we obtained 3 novel recombinant monoclonal antibodies to the Ebola virus glycoprotein. The epitope specificity of the resulting recombinant antibodies was studied using commercial neutralizing antibodies to the viral glycoprotein. It was shown that the recombinant antibodies obtained recognize epitopes of the glycoprotein matching or overlapping with the epitopes of three well-studied neutralizing antibodies against the Ebola virus.

The research aimed at the generation of virus neutralizing recombinant monoclonal antibodies specific to the rabies virus glycoprotein resulted in the development of a pair of a humanized and a fully human antibodies. Its combination may be used as a basis for the development of the antibody cocktail for the post-exposure prophylaxis of rabies and could replace polyclonal serum immunoglobulin that is used now.

The work was carried out using financial support from the Russian Ministry of Science and Education (projects RFMEFI60714X0060, RFMEFI60714X0096, RFMEFI60716X0154).

## ТРИ ПОДХОДА К РАЗРАБОТКЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ: КОНТРАКТНОЕ, САМОСТОЯТЕЛЬНОЕ И КОМБИНИРОВАННОЕ

**В. Климович**

*Sartorius Stedim North America, 11716, USA, 5 Orville, Drive, Suite 200–Bogemia NY, e-mail: vitaly.klimovich@sartorius-stedim.com*

В настоящее время такая группа лекарственных препаратов как моноклональные антитела становится все более и более востребованной в медицине. Сегодня из 10 самых продаваемых препаратов в мире 8 являются моноклональными антителами. Более того, на различных этапах регистрации и разработки находятся еще десятки препаратов, а количество патентов, описывающих терапевтическое использование моноклональных антител, исчисляется тысячами. Это не могло не привлечь к этой группе препаратов внимание различных фармпроизводителей: от гигантов фармацевтического бизнеса до небольших стартапов.

**Ключевые слова:** контрактное производство, экономическая эффективность, моноклональные антитела

На сегодняшний день существует несколько подходов к разработке процессов получения и очистки моноклональных антител – некоторые компании предлагают проведение контрактных исследований, некоторые проводят такие исследования самостоятельно, а некоторые – используют комбинированный подход, привлекая внутренние и внешние ресурсы. При этом каждый из подходов имеет свои преимущества. Самостоятельные исследования позволяют оперативно модифицировать схемы и дополнительно получать материалы для проведения научных изысканий, однако требуют наличия специалистов и оборудования прямо на месте. Поскольку стоимость современных аналитических систем часто оказывается очень значительной подобный подход оправдывает себя только в случае, когда исследовательская база уже существует или же если планируется разработка множества продуктов. Дополнительные сложности возникают при выборе экспрессионной системы – хозяина. Самостоятельная разработка системы может занять очень значительное время, притом возможно, что с точки зрения индустриализации полученная система окажется неидеальной – ведь она должна сочетать хороший рост, высокий титр и генетическую стабильность с высокой механической устойчивостью. Разработка и тестирование подобной системы может занять несколько лет, что не всегда целесообразно для осуществления одиночных проектов. С другой стороны, большинство коммерческих систем высокой эффективности для исследовательских целей доступны по сравнительно низкой цене, однако лицензии на коммерческое использование могут стоить значительно дороже и часто подразумевают выплату роялти. Использование контрактных разработчиков позволяет избежать значительной части этих проблем – они как правило уже имеют опыт разработки и лицензирования клеточных линий (а часто и владеют правами на какие-либо промышленные линии) и располагают всем оборудованием, необходимым для проведения исследований и характеристики препарата. Однако при использовании контрактных исследований возникает другая проблема – стоимость работы исследователей обычно выше, чем при самостоятельной разработке а после успешного завершения требуется провести трансфер технологии на производственную площадку клиента, при этом, как правило, возникает парадоксальная ситуация: чем лучше разработан процесс в лаборатории тем сложнее его перенести на уже существующую площадку. Решением подобных проблем может быть создание производства под конкретный препарат, уже после окончания разработки, однако в данном случае все упирается в жесткие временные рамки. Комбинированные решения, использующие преимущества обоих подходов, позволяют обойти многие сложности – ограниченный объем проводимых сторонней организацией исследований позволяет минимизировать затраты на их проведение, сохраняя сжатые временные рамки, а индустриализация процесса на месте позволяет выполнить масштабирование и валидацию в конкретных условиях будущего производства. Менеджмент подобных проектов несколько отличается от классических подходов, однако позволяет во многом упростить процесс в целом.

Сравнение преимуществ и слабых мест различных подходов, оценка эффективности на примере реализованных проектов и обсуждение открывающихся возможностей является важной задачей для многих исследователей и производителей биофармацевтических препаратов. Наша задача – дать объективную и профессиональную оценку трех подходов, чтобы помочь компаниям выбрать наиболее оптимальный для них.



## THREE APPROACHES TO THE DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES: CONTRACTE, INDEPENDENT AND COMBINED

**V.Klimovich**

*Field Application Specialist Cell Culture Media*

*Sartorius Stedim North America, 11716, USA, 5 Orville, Drive, Suite 200–Bogemia NY, e-mail: vitaly.klimovich@sartorius-stedim.com*

At present, such group of pharmaceuticals as monoclonal antibodies is becoming more and more in demand in medicine. Today, eight most marketable pharmaceuticals out of ten in the world are monoclonal antibodies. Moreover, dozens of products are undergoing different registration or development stages while the number of patents describing the therapeutic use of monoclonal antibodies amounts to thousands. This pharmaceutical group could not but attract the attention of various pharmaceutical manufacturers ranging from pharmaceutical business giants to small startups.

**Key words:** contract manufacturing, cost effectiveness, monoclonal antibodies

Currently, there are several approaches to the development of processes for production and purification of monoclonal antibodies. Some companies offer contract studies, some conduct such studies on their own, and some use a combined approach involving internal and external resources. In that case, each of the approaches has its own advantages. Independent researches allow quick modification of all schemes and additional obtainment of materials for scientific research, but they require the availability of specialists and equipment directly on site. Considering the fact that the cost of modern analytical systems is often very significant, that approach pays its way only in case of the existing research infrastructure or when a great number of products are to be developed. Further complications occur when choosing the host expression system. Self-development of the system may take a significant period of time, while the resulting system may possibly turn out to be imperfect from the industrialization point of view, because it ought to combine good growth, high titre and genetic stability combined with high mechanical stability.

Development and testing of such system may take several years, which is not always suitable for single projects. On the other hand, most of commercial high-performance systems for research purposes are available at a relatively low price, but licenses for commercial use may have a significantly bigger price and often include royalty payment. Engagement of contract developers avoids a significant part of these problems, because usually they already have an experience in the development and licensing of cell lines (and often they own the rights to some production lines) and have all the equipment necessary for research and characterization of the drug.

However, when using contract research, there arises another problem. Researchers' work costs are usually higher than in case of self-development; and after successful completion it is required to perform technology transfer to the client's production site. As a rule, there arises paradox, as the better process was developed in the laboratory, the more difficult would be its transfer to the existing production site. Arrangement of production for a specific drug may become a solution for such problems, even after the development completion, but in that case, everything depends on tight timing constraints. Combined solutions that take advantage of both approaches allow to avoid many difficulties. Limited amount of research conducted by a third-party organization can minimize activity costs, while maintaining a tight timeframe, while industrialization of the process on site allows performing scale-up and validation in specific conditions of future production. The management of such projects differs from the classical approaches, but allows to simplify the process in whole. Comparing the strengths and weaknesses of different approaches, evaluating the effectiveness of the implemented projects and opening opportunities discussion is an important task for many researchers and biopharmaceutical drugs manufacturers. Our main goal is to provide an objective and professional assessment of three approaches in order to help companies choose the best option.

УДК 543.544.17

## УДАЛЕНИЕ АГРЕГАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИИ НА АФФИННОМ СОРБЕНТЕ

Годованный А.В., Чеботарева А.В., Гардеева Л.Ф., Селищев С.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва, Россия 117545, Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, дом No 1  
e-mail: artemgodo@gmail.com

Разработан метод очистки субстанции рекомбинантного моноклонального антитела класса IgG1 от агрегатов с помощью аффинной хроматографии на сорбенте с белком А. Обнаружена важность линейной скорости потока для эффективности данного процесса.

**Ключевые слова:** агрегаты антитела; сорбент с белком А; аффинная хроматография.

Агрегаты рекомбинантных моноклональных антител класса IgG являются хорошо известной примесной модификацией [1]. Поскольку они обладают высокой иммуногенностью, разработано много подходов, которые с переменным успехом приводят к уменьшению их уровня ниже 1%. В данной работе описан новый метод удаления агрегатов за одну хроматографическую стадию с применением колонки с белком А. Использование аффинной хроматографии для таких целей не было описано в литературе ранее.

Для всех экспериментов был использован сорбент MabSelect Sure LX (GE) в корпусах HiTrap 5 ml (GE) или HiScale 26/40 (GE). В качестве исходного материала для очистки использовали субстанцию моноклонального антитела с чистотой  $97,15\% \pm 0,25\%$ , по данным гель-фильтрации. Количество белка, наносимого на сорбент без потерь при концентрации 3 г/л, было определено ранее и составило 40 мг на 1 мл сорбента, при времени контакта белка с сорбентом 8 минут. Первые эксперименты производили с использованием сорбента в корпусе HiTrap. Сначала элюцию антитела производили понижающимся градиентом pH с использованием фосфатно-цитратной буферной системы. Было обнаружено, что содержание мономера антитела в ранних фракциях элюата было выше, чем в поздних. Основываясь на этом, была разработана ступенчатая схема элюции. Фракцию антитела, обогащенную мономером, элюировали буферным раствором с pH 3,9. Содержание мономера в данной фракции составило  $99,37 \pm 0,07\%$  при выходе  $78,1 \pm 2,3\%$  (эксперимент был проведен в трех повторностях). Масштабирование данного процесса было произведено в 21,4 раза с использованием корпуса HiScale 26/40 (GE) с высотой сорбента 20,2 см, колонна объемом 107 мл. Процессы нанесения и элюции производили при скорости потока, рассчитанной на основе времени контакта раствора с сорбентом 8 минут. Рабочая скорость потока составила 13,4 мл/мин. При этом промывка колонны буферным раствором с pH 3,9 не приводила к элюции обогащенной мономером антитела фракции. Содержание мономера в элюате в двух экспериментах составило 97,8% и 98,2%. Причиной снижения эффективности удаления агрегатов в результате масштабирования процесса может являться изменение геометрии колонны, и сопутствующее изменение линейной скорости потока. Для проверки этого предположения был произведен процесс с линейной скоростью потока 0,31 см/мин (1,6 мл/мин), соответствующей таковой при проведении процесса в меньшем масштабе, с использованием корпуса HiTrap. При этом элюат, собранный при промывке буферным раствором с pH 3,9, был обогащен мономерами антитела. Содержание мономеров составило  $99,45\% \pm 0,15\%$  (эксперимент был проведен в трех повторностях).

Основываясь на описанных выше наблюдениях, при разработке стадии захвата антитела из культуральной жидкости имеет смысл использовать элюирующий буфер с максимальным эффективным значением pH, для получения обогащенной мономерами фракции.

Описанный здесь подход к удалению агрегатов антител может быть эффективен не во всех случаях, поскольку в литературе есть описание различных типов агрегатов, наблюдаемых в растворах антител [1].

Литература:

1. Plath F. et al. Characterization of mAb dimers reveals predominant dimer forms common in therapeutic mAbs // mAbs. 2016. Vol. 8. No 5. P. 928-940.

UDC 543.544.17

## REMOVAL OF MONOCLONAL ANTIBODY AGGREGATES BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

**Godovannyi A.V., Chebotareva A.V., Gardeeva L.F., Selischev S.V.**

*State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia  
117545, Russia, Moscow, 1-yi Dorojnyi proezd, 1  
e-mail: artemgodo@gmail.com*

The method of recombinant monoclonal IgG1 antibody aggregates removal with protein A affinity chromatography is developed. A linear flow rate is shown to be important for efficiency of this process.

**Key words:** antibody aggregates; protein A resin; affinity chromatography.

Aggregates are well known unfavorable modifications of class IgG recombinant monoclonal antibodies [1]. As they are highly immunogenic, different approaches were involved to reduce their amount below 1%, and they are always challenging. This paper describes the new method for aggregates removal in one chromatographic step utilizing Protein A column. The use of affinity resin for such purposes has not been described in the literature yet.

MabSelect Sure LX resin (GE) was employed for all the experiments in HiTrap 5 ml (GE) or HiScale 26/40 (GE) columns. The starting material was a substance of the antibody with  $97,15 \pm 0,25\%$  monomer content, estimated by size-exclusion chromatography. The antibody solution was loaded onto the column in the same quantity and in similar concentration as in the capture step developed earlier: concentration 3 g/L, 40 mg of antibody per ml of resin (8 minutes contact time). Initial experiments were performed with HiTrap column. Elution was performed with reducing pH-gradient using phosphate-citrate buffer system. The antibody monomer content in early elution fractions was higher than in late fractions. Basing on this observation, stepwise elution method was developed. Monomer-enriched fraction was eluted with pH 3.9 buffer. The monomer content in this fraction was  $99.37 \pm 0.07\%$  and the yield was  $78.1 \pm 2.3\%$  (the experiment was performed in triplicates).

Scaling up of this process was performed with coefficient 21.4 using HiScale 26/40 column (GE) with resin height 20.2 cm and volume 107 ml. Loading and elution were performed with flow rate 13.4 ml/min, basing on 8 minutes contact time. Column wash with pH 3.9 buffer solution did not result in elution of monomer-enriched fraction. The monomer content in the eluted fraction was 97.8% or 98.2% in two separate experiments. The reason of reduced efficiency of aggregate removal in the scaled up process may be a change in the column geometry, which results in differences in linear flow rate. To check this assumption a process with the same linear flow rate as in initial step was performed. The linear flow rate was 0.31 cm/min (1.6 ml/min). The fraction eluted with pH 3.9 buffer solution was enriched with antibody monomers with  $99.45\% \pm 0.15\%$  monomer content (the experiment was performed in triplicates).

The described approach for antibody aggregates elimination may not be effective in all cases. Different kinds of aggregates with different properties were observed in IgG formulations [1].

### References:

1. Plath F. et al. Characterization of mAb dimers reveals predominant dimer forms common in therapeutic mAbs // *mAbs*. 2016. Vol. 8. No 5. P. 928-940.

УДК 616.982.27

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ DOT-ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИГЕНОВ BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI

Негоденко А.О., Храпова Н.П.

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия  
400131, Волгоградская область, Волгоград, ул. Голубинская, д. 7  
e-mail: negodenkoao@yandex.ru

Доказана эффективность применения dot- иммуноферментного анализа для экспресс - обнаружения антигенов возбудителя мелиоидоза. Подтверждена высокая активность и специфичность детектирующих моноклональных антител 2А6 – основы иммунопероксидазного конъюгата, обеспечивающих выявление гликопротеина в составе 10 из 11 исследованных образцов, приготовленных из обеззараженных клеток буркхольдерий II группы патогенности.

**Ключевые слова:** Burkholderia pseudomallei, водно-солевой экстракт, экстрацеллюлярный антиген, моноклональные антитела, dot- иммуноферментный анализ, обнаружение.

В последнее время становится очевидным стремление к снижению стоимости диагностических процедур и использованию методов относительно простых в исполнении, не требующих дорогостоящего оборудования и существенных затрат времени. В связи с этим разработана и внедряется в практику модификация иммуноферментного анализа – dot- иммуноферментный анализ (dot-ИФА).

Целью работы являлась разработка оптимальных условий выполнения dot – ИФА и оценка его возможностей для диагностики антигенов патогенных буркхольдерий.

В работе были использованы водно-солевые экстракты (ВСЭ) из обеззараженных микробных клеток Burkholderia pseudomallei, обработанных ультразвуком и экстрацеллюлярные антигены (ЭЦА) возбудителя мелиоидоза, изолированные из жидких сред выращивания с помощью гель-хроматографии. Всего в работе были использованы 11 коллекционных штаммов B. pseudomallei, выделенные в разное время во Вьетнаме из образцов клинического материала: 56830, 57562 С-141, 56812, 57576, 1, 2, 100, 51274, 56738, 56770.

В качестве твердой фазы использовали нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) фирмы Amersham Hybond-C Extra (Швеция) с величиной пор 0,45 мкм.

Иммунопероксидазные конъюгаты (ИПК) готовили на основе мышиных моноклональных антител (МКА) 2А6, взаимодействующих с гликопротеином капсулы возбудителя мелиоидоза. Источником получения МКА являлись гибридомы-продуценты этих моноклональных IgG узкой специфичности.

В работе применяли прямой вариант dot – ИФА. Условия постановки реакции соответствовали известным стандартам. Образцы испытуемых проб, приготовленных на 0,1М ФБР, рН 7,4 с 0,05 % твин-20, наносили на расчерченную на квадраты со сторонами 0,5см НЦМ по 3 мкл, выдерживали при + 4 °С в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали в 1 % растворе «Gelatin from cold water fish skin», в течение 30 мин при 37 °С, отмывали, подсушивали и обрабатывали ИПК в рабочем разведении. На завершающем этапе реакции использовали субстратную смесь, состоявшую из хромогена - 4-хлор-1-нафтола и перекиси водорода. Учет результатов реакции проводили через 20-30 мин визуально.

Из 11 проверенных образцов ВСЭ антигенов положительные результаты получили с 10 образцами. Отрицательный результат был зарегистрирован с водорастворимым антигеном штамма 59361, что свидетельствует об отсутствии в составе данного образца ВСЭ гликопротеина капсулы характерного для вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза. (табл. 1)

Таблица 1. Результаты исследования образцов ВСЭ B. pseudomallei

ИПК	АГ										
	56830	С-141	56812	57576	57562	1	2	100	51274	56738	56770
2А6 1:40	+	±	+	+	-	±	+	+	±	+	+

«+» - яркое окрашивание

«±» - слабое окрашивание

«-» - отрицательный результат

УДК 616.982.27

## EFFICACY OF A DOT-ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY IN DETECTING BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI ANTIGENS

Negodenko A.O., Khrapova N.P.

FKUZ Volgograd Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Volgograd, Russia  
400131, Volgograd Region, Volgograd, Golubinskaya street, 7  
e-mail: negodenkoao@yandex.ru

The dot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) has been shown to be effective in rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* antigens. 2A6 immunoperoxidase-conjugated monoclonal antibodies have demonstrated high activity and specificity in detecting glycoproteins in 10 out of 11 samples prepared from disinfected *Burkholderia* pathogenicity group II cells.

**Key words:** *Burkholderia pseudomallei*, a water-salt extract, an extracellular antigen, monoclonal antibodies, immunoperoxidase conjugate, a dot-enzyme-linked immunosorbent assay, detection.

The last few years have seen attempts to reduce the cost of diagnostic procedures and to use time-sparing technically simple methods which do not require expensive equipment. In this regard, a modified enzyme-linked immunosorbent assay, the dot-enzyme-linked immunosorbent assay, has been developed and is currently being implemented into practice.

The aim of this article was to develop optimal conditions for implementation of the dot-ELISA and to assess its potential in detecting *Burkholderia pseudomallei* antigens.

We used water-salt extracts (WSE) which had been obtained from disinfected *Burkholderia pseudomallei* cells and further sonicated as well as extracellular antigens (ECA) of melioidosis pathogen which had been isolated from liquid growth media by gel chromatography. A total of 11 *B. pseudomallei* collection strains isolated from clinical samples (56830, 57562 C-141, 56812, 57576, 1, 2, 100, 51274, 56738, 56770) at different times in Vietnam were used.

We used a nitrocellulose membrane (NCM) (Amersham Hybond-C Extra (Sweden)) with a pore size of 0.45 µm as a solid phase. It was previously pre-treated with saline and dried.

Immunoperoxidase conjugates (IPC) were prepared from 2A6 murine monoclonal antibodies (MCA) which interacted with the glycoprotein of the melioidosis pathogen capsule. MCAs were obtained from hybridoma cells of the monoclonal IgG cells with a narrow specificity.

We used a direct dot-ELISA. The reaction conditions met the required standards. The samples (3 µl) prepared on 0.1 M PBS, pH 7.4 with 0.05% Tween-20 were applied onto the squared NCM with the sides of 0.5 cm and were kept at +4 °C for 1 hour. The membrane was then incubated in a 1% solution of "Gelatin from cold water fish skin" for 30 minutes at 37 °C, washed, dried and treated with PKI in the initial dilution. At the final stage of the reaction a substrate mixture consisting of chromogen-4-chloro-1-naphthol and hydrogen peroxide was used. The results were recorded visually after 20-30 min.

Of the 11 tested samples of the antigen-positive antibody, positive results were obtained with 10 samples. A negative finding was recorded with the water-soluble antigen of 59361 strain, suggesting the lack of capsular glycoprotein which is characteristic of the virulent strains of melioidosis pathogens (Table 1).

Table 1. Data on WSEs obtained from disinfected *B. pseudomallei*

IPCs	AG										
	56830	C-141	56812	57576	57562	1	2	100	51274	56738	56770
2A6 1:40	+	±	+	+	-	±	+	+	±	+	+

"+" - strong staining

"±" - weak staining

"-" - negative findings

УДК: 616.982.27

## ТЕСТ СИСТЕМА ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ-МАРКЕРУ ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА: КОНСТРУИРОВАНИЕ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

**Т.В.Замарина**

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград, Россия, Россия, 400131, Волгоград, Голубинская, 7, bultan@inbox.ru, 89889634090

Описаны критерии подбора компонентов экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе моноклональных антител (МКА) различной эпитопной направленности к гликопротеину капсулы 200 kDa возбудителя мелиоидоза и определены её диагностические возможности.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела, диагностика, мелиоидоз, твёрдофазный иммуноферментный метод

Приоритетным направлением совершенствования средств обнаружения возбудителя мелиоидоза является конструирование иммунодиагностических тест-систем на основе МКА, что позволяет повысить чувствительность и специфичность диагностических реагентов. Панель МКА к диагностически значимому капсульному гликопротеину *B. pseudomallei*, основному маркеру вирулентных штаммов данного патогена (1), была получена в Волгоградском противочумном институте. Целью работы являлось создание тест-системы иммуноферментной на основе МКА к гликопротеину капсулы 200 kDa возбудителя мелиоидоза и определение ее диагностических возможностей.

МКА были накоплены *in vivo* в брюшной полости инбредных белых мышей линии BALB/c. Затем смесь антител (от 3 до 5 вариантов) адсорбировали на пластинах Costarhighbinding. Контрольным антигеном являлся формамидный экстракт 200 kDa *B. pseudomallei*100. Иммунопероксидазные конъюгаты (ИПК) готовили на основе МКА по методу NakaneP.K., KawaoiA. Оптимальный состав смеси антител, адсорбируемых на планшете, определяли, ориентируясь на данные об их конкурентном взаимоотношении и индексах аддитивности.

Экспериментальная тест-система (сэндвич-вариант ТИФМ) была сконструирована по следующей схеме: АТ1+АГ+АТ2 (ИПК). Антитела первого порядка (АТ1), - смесь из трех вариантов МКА (3С6+5С2+2А6) в суммарной концентрации 20 мкг/мл; ИПК (АТ2) готовили на основе МКА 5С2. Такой состав тест-системы обеспечивал наибольшую чувствительность реакции.

При проверке чувствительности полученной тест-системы в реакции с различными образцами гликопротеина капсулы *B. pseudomallei*100 были получены доказательства того, что оптимизированные условия подготовки твердой фазы, применение ИПК на основе МКА 5С2 обеспечивают высокую чувствительность иммуноферментного анализа (2,5 мкг/мл). Также установлено, что тест-система выявляет различия в качестве серий образцов гликопротеина капсулы возбудителя мелиоидоза. В перспективе полученные результаты позволят повысить контроль выделения антигена и определять критерии оценки его содержания в контрольных образцах.

С помощью тест-системы проводили анализ водно-солевых экстрактов (ВСЭ) антигенов капсулообразующих буркхольдерий II-III групп патогенности (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. seracia*) на содержание гликопротеина 200 kDa. Минимально детектируемые количества АГ в ВСЭ гетерологичных микроорганизмов была значительно ниже, чем у гомологичных штаммов.

В реакции с ВСЭ и экстрацеллюлярными экстрактами (ЭЦА) возбудителей сапа и мелиоидоза, были получены данные о том, что содержание антигена 200 kDa в ЭЦА выше, чем в ВСЭ клеток буркхольдерий, что соответствует данным зарубежных исследователей.

В результате проведенного исследования были получены доказательства эффективности применения экспериментальной тест-системы для выявления патогенных буркхольдерий в различных пробах.

Литература:

1. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., Sirisinha S. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the *in vitro* growth of virulent Ara- and avirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* // *Acta trop.* – 2000. - № 74. – P.221–228.

**Финансирование:** Федеральное

UDC: 616.982.27

## EXPERIMENTAL ELISA KIT BASED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST 200 KDA ANTIGEN: DESIGN AND APPLICATION EFFICIENCY

**T.Zamarina**

Federal Government Health Institution «Volgograd Plague Control Research Institute», Volgograd, Russia, Russia, 400131, Volgograd, Golubinskaya, 7

We described the criteria of the component selection for the development of an experimental ELISA kit, based on monoclonal antibodies (Mabs) against different epitopes of 200 kDa antigen of *Burkholderia pseudomallei* and determined its diagnostic capabilities

**Key words:** a monoclonal antibody, diagnosis, melioidosis, an enzyme-linked immunosorbent method

The priority direction of improving the detection instrument of the melioidosis causative agent is the construction of immunodiagnostic test systems based on Mabs, which makes it possible to increase the sensitivity and specificity of diagnostic reagents. The panel of the Mabs against the diagnostically significant capsule glycoprotein of *B. pseudomallei*, the main feature of the virulent strains of this pathogen (1), was obtained at the Volgograd Antiplague Institute. The aim of the work was to create an ELISA kit based on Mabs against the 200 kDa capsule glycoprotein of melioidosis agent and determine its diagnostic capabilities.

Mabs had been accumulated *in vivo* in the abdominal cavity of mice inbred strain BALB/c. Then a mixture of antibodies (from 3 to 5 variants) were adsorbed on Costar high binding plates. The control antigen was formamide extract of 200 kDa *B. pseudomallei* 100. Horseradish peroxidase conjugated Mabs (HRP) were prepared using the Nakane P.K., Kawaoi A. method. The optimal composition of the antibody mixture adsorbed on the plate was determined due to the data on the competitive relationship between the antibodies and the affinity constants.

The experimental test system (Sandwich ELISA) was constructed according to the following scheme: AT1 + AG + AT2 (HRP). First-order antibodies (AT1), a mixture of three Mabs (3C6 + 5C2 + 2A6) in a total concentration of 20 µg / ml; HRP (AT2) was prepared on the basis of Mab 5C2. Such a composition of the test system provided the greatest sensitivity of the reaction.

The examination of ELISA kit's sensitivity in reaction with various samples of the capsule glycoprotein *B. pseudomallei* 100 shown that optimized conditions for the preparation of the solid phase and the use of horseradish peroxidase conjugated mab 5C2 provided high sensitivity of ELISA (2,5 µg/ml). Also experimental ELISA kit can reveal differences in the quality of the capsule glycoprotein samples *B. pseudomallei*. In the future, the obtained results will allow to improve the control of antigen extraction and determine the criteria for assessing its content in control samples.

We analysed the content of 200 kDa antigen in water-salt extracts of the capsule-forming *Burkholderia* pathogenicity groups II-III (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*) through the ELISA kit. The minimum detectable amount of antigen was significantly lower in heterologous microorganisms.

We obtained the data on 200 kDa antigen content in extracellular extracts. It was higher in extracellular extracts of *Burkholderia* cells, which corresponds to the data of foreign researchers.

As a result of the study, it was shown the efficacy of using an experimental test system for the detection of pathogenic *Burkholderia* spp. in a variety of objects.

### References:

1. Anuntagool N., Panichakul T., Aramsri P., Sirisinha S. Shedding of lipopolysaccharide and 200-kDa surface antigen during the *in vitro* growth of virulent Ara- and avirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* // *Acta trop.* – 2000. - № 74. – P.221–228.

**Grant:** Federal

## РЕГЕНЕРАТИВНАЯ И КЛЕТочНАЯ МЕДИЦИНА

### REGENERATIVE AND CELLULAR MEDICINE

1. КЛЕТочНАЯ ТЕРАПИЯ БЕЗ КЛЕТОК КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПОДХОД В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ, Кузнецова Е.С., Сагарадзе Г.Д., Басалова Н.А., Григорьева О.А., Нибирицкий П.П., Макаревич П.И., Ефименко А.Ю., .....	517
CELL-FREE CELL THERAPY AS A PROMISING APPROACH FOR REGENERATIVE MEDICINE, Kuznetsova E.S., Sagaradze G.D., Basalova N.A., Grigorieva O.A., Nimiritsky P.P., Makarevich P.I., Efimenko A.Yu. ....	518
2. НАПРАВЛЕННАЯ НЕЙРАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В 3D-СИСТЕМЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НООТРОПНОГО ПРЕПАРАТА, Д.И. Салихова, Г.Е. Леонов, И.А. Федюнина, С.Л. Киселев, Т.Б. Бухарова, Д.В. Гольдштейн .....	519
DIRECTION NEURAL DIFFERENTIATION OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS IN A 3D-SYSTEM FOR OBTAINING A NOOTROPIC PREPARATION, DI. Salikhova, G.E. Leonov, I.A. Fedyunina, S.L. Kiselev, T.B. Bukharova, D.V. Goldshtein 518531 .....	520
РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В НЕЙРАЛЬНЫЕ С ПОМОЩЬЮ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ, Е.М. Самойлова, В.А. Кальсин, С.Л. Котова, В.П. Баклаушев .....	521
REPROGRAMMING MESENCHYMAL STEM CELL INTO NEURAL CELLS USING SMALL MOLECULES, E.Samoylova, V.Kalsin, S.Kotova, V.Baklaushev .....	522

УДК 57.017.35

## "КЛЕТочНАЯ ТЕРАПИЯ БЕЗ КЛЕТОК" КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПОДХОД В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Кузнецова Е.С.<sup>1,2</sup>, Сагарадзе Г.Д.<sup>1,2</sup>, Басалова Н.А.<sup>1</sup>, Григорьева О.А.<sup>1</sup>, Нибирицкий П.П.<sup>1,2</sup>, Макаревич П.И.<sup>1,2</sup>, Ефименко А.Ю.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт регенеративной медицины, медицинский научно-образовательный центр, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

119192, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 10

<sup>2</sup> Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

e-mail: kuznecova2793@mail.ru

Разработаны технологии получения биоактивных секреторных компонентов МСК человека, включая фракции кондиционированной среды и децеллюляризованный материал на основе белков внеклеточного матрикса, для применения в регенеративной медицине.

**Ключевые слова:** мезенхимные стромальные клетки, бесклеточная терапия, кондиционированная среда, секретом МСК, децеллюляризация

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) рассматриваются в качестве перспективного инструмента для регенеративной медицины. Согласно последним данным основным механизмом терапевтических эффектов МСК является продукция этими клетками различных биологических активных компонентов, включая растворимые факторы, внеклеточные везикулы, а также белки внеклеточного матрикса (ВКМ), стимулирующих ангиогенез, нейрогенез, активацию резидентных стволовых и прогениторных клеток и модуляцию иммунных реакций. Кроме того, продукты секреции МСК, такие как кондиционированная среда (МСК-КС) и/или ее фракции, а также децеллюляризованный материал на основе белков ВКМ, секретированных МСК, могут иметь значительные преимущества перед клеточной терапией с точки зрения биобезопасности, организации производства и стабильности конечного продукта. В ряде работ показаны выраженные регенеративные эффекты МСК-КС на различных экспериментальных моделях повреждения тканей. Однако подходы к получению продуктов секреции МСК существенно варьируют и зачастую не обоснованы исследователями. При этом, вклад отдельных компонентов секрета МСК в реализацию полученных эффектов остается невыясненным. Основной целью настоящей работы является оптимизация



протоколов получения ключевых биоактивных продуктов, секретируемых человеческими МСК, выделенными из жировой ткани (МСК ЖТ).

На основе анализа динамики накопления в кондиционированной среде ключевых факторов роста, опосредующих паракринные эффекты МСК, мы разработали оптимизированный протокол получения МСК-КС, методы ее стандартизации и тестирования на клеточных моделях. Разработанная технология была апробирована для создания комбинированного биоматериала, включающего МСК-КС и коллаген I типа в качестве биополимерного носителя, для стимуляции восстановления сперматогенеза. Было показано, что МСК секретируют молекулы, поддерживающие выживаемость и функцию сперматогонимальных стволовых клеток, а также вспомогательных клеток, таких как клетки Сертоли и клетки Лейдига. На модели экспериментального крипторхизма у крыс мы выявили, что разрабатываемый биоматериал способствовал эффективному восстановлению нарушенного сперматогенеза. Введение материала под белочную оболочку яичка приводило к уменьшению выраженности гипотрофии крипторхизированных яичек, оказывало выраженное стимулирующее действие на сперматогенез; в результате наблюдали повышение общего количества сперматозоидов и их подвижной фракции, а также восстановление клеток Сертоли и Лейдига.

С целью изучения и использования стромальных компонентов, секретируемых МСК, были разработаны подходы к получению децеллюляризованного биоматериала на основе стромальных белков, секретируемых МСК человека, культивируемых в составе клеточных пластов. Нами были подобраны протоколы децеллюляризации клеточных пластов из иммортализованных МСК жировой ткани человека (ASC52telo, ATCC). В качестве агентов для децеллюляризации были выбраны химические (CHAPS, Sodium deoxycholate) и биологические агенты (ДНКаза I и индуктор апоптоза ротенон). Было показано, что децеллюляризованный материал имеет сетчатую и разветвленную структуру. Оптимизированные протоколы децеллюляризации позволяют сохранить ключевые белки внеклеточного матрикса (коллаген I типа, фибронектин, ламинин). Кроме того, полученный биоматериал поддерживает адгезию и пролиферацию МСК и эндотелиальных клеток человека (HUVEC).

Таким образом, нами были разработаны технологии получения биоактивных секреторных компонентов МСК человека, включая фракции кондиционированной среды и децеллюляризованный материал на основе белков внеклеточного матрикса, секретируемых МСК, а также показана перспективность их использования для стимуляции восстановления поврежденных тканей. Результаты наших исследований могут стать основой для разработки и внедрения новых бесклеточных продуктов для регенеративной медицины.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00403, работы по разработке биоматериала для стимуляции сперматогенеза) и Минобрнауки РФ (грант Президента РФ МК-2422.2017.7, работы по разработке децеллюляризованного биоматериала).

UDC 57.017.35

## CELL-FREE CELL THERAPY AS A PROMISING APPROACH FOR REGENERATIVE MEDICINE

Kuznetsova E.S.<sup>1,2</sup>, Sagaradze G.D.<sup>1,2</sup>, Basalova N.A.<sup>1</sup>, Grigorieva O.A.<sup>1</sup>, Nimiritsky P.P.<sup>1,2</sup>, Makarevich P.I.<sup>1,2</sup>, Efimenko A.Yu.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

119192, Lomonosovskij ave, 27/10

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, e-mail: kuznecova2793@mail.ru

Methods of obtaining the MSC secreted products were received for approach in regenerative medicine including fractions of conditioned media and decellularized material based on proteins of extracellular matrix.

**Key words:** mesenchymal stromal cells, cell-free cell therapy, conditioned medium, MSC secretome, decellularization

Mesenchymal stromal cells (MSC) are considered as a promising tool for regenerative medicine. According to contemporary data, the main mechanism of therapeutic effects of MSC is the secretion of various biologically active components, including soluble factors (SF), extracellular vesicles (EV), as well as extracellular matrix (ECM)

components that stimulate angiogenesis, neurogenesis, activation of tissue-specific resident stem and progenitor cells, and modulate immune reactions. Additionally, the secretome of MSC, particularly as conditioned medium (MSC-CM), and/or its fractions as well as decellularized material based on the secreted ECM proteins can have significant advantages over cell therapy in terms of biosafety, manufacturing and stability of the endpoint product. Furthermore, outstanding regenerative effects of conditioned medium containing the secretion products of MSC were shown in various experimental models of tissue damage. However, approaches to MSC secretome-based products manufacturing vary considerably and are often not justified by researchers. Additionally, the contribution of individual components of MSC secretome in preparation efficacy remains unclear. The main purpose of this work was to optimize the protocols for obtaining key bioactive products secreted by human MSC isolated from adipose tissue (AT MSC).

Based on accumulation dynamics analysis of MSC-secreted key growth factors mediating the paracrine effects of these cells, we developed an optimized protocol for obtaining MSC-CM, standardization methods and tests on cellular models. The developed technology was applied to create combined biomaterial including MSC-CM and type I collagen as a biopolymer carrier to stimulate recovery of spermatogenesis. It was shown that MSC secrete molecules that support the survival and function of spermatogonial stem cells, as well as Sertoli cells and Leydig cells. We found that developing biomaterial influenced the effectively restoration of impaired spermatogenesis in the model of experimental cryptorchidism in rats. The subtunical injection of this material resulted in a decrease of hypotrophy of cryptorchid testicles, stimulating effect on spermatogenesis; as a result, an increase of total spermatozoa number and their moving fraction was observed as well as the restoration of Sertoli and Leydig cells.

In order to study and use the stromal components secreted by MSC, approaches for the manufacturing of a decellularized biomaterial based on the stromal proteins secreted by human MSC cultured as cell sheets have been developed. We have selected protocols for decellularization of cell sheets from immortalized AT MSC (ASC52telo, ATCC). As agents for decellularization chemical (CHAPS, Sodium deoxycholate) and biological agents (DNase I and apoptosis inducer rotenone) were chosen. It was shown that the decellularized material had a meshed and branched structure. Optimized decellularization protocols allowed the key ECM proteins (collagen type I, fibronectin, laminin) to be retained. In addition the manufactured biomaterial supports the adhesion and proliferation of MSCs and human endothelial cells (HUVEC).

Thus, we have developed technologies for manufacturing of products based on bioactive secretory components of human MSC, including fractions of conditioned medium and a decellularized material based on extracellular matrix proteins, and also demonstrated the perspective of their using for stimulating the regeneration of tissues damages. The results of our research might form the basis for development and implementation of novel cell-free products to regenerative medicine.

The study was supported by Russian Foundation for Basic Research (grant №18-315-00403, development of the biomaterial for the spermatogenesis restoration) and Russian Ministry of Science and Education (grant #МК-2422.2017.7, development of the decellularized biomaterial).

УДК 616.8

## **НАПРАВЛЕННАЯ НЕЙРАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В 3D-СИСТЕМЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НООТРОПНОГО ПРЕПАРАТА**

**Д.И. Салихова<sup>1</sup>, Г.Е. Леонов<sup>1</sup>, И.А. Федюнина<sup>1</sup>, С.Л. Киселев<sup>1,2</sup>, Т.Б. Бухарова<sup>1</sup>, Д.В. Гольдштейн<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Медико-генетический научный центр, ул. Москворечье, д. 1, Москва, Россия 115522

<sup>2</sup> Институт общей генетики им. В. И. Вавилова РАН, ул. Губкина, д. 3, Москва, Россия 119333  
e-mail: diana\_salikhova@bk.ru

Разработан протокол направленной нейральной дифференцировки ИПСК человека в 3D-системе без использования компонентов ксеногенного происхождения для получения ноотропного препарата.

**Ключевые слова:** нейральная дифференцировка ИПСК, нейросферы, ноотропный препарат.

В настоящее время наблюдается неуклонный рост заболеваний центральной нервной системы сосудистого, токсического, инфекционного и аутоиммунного генеза, при этом эффективность методов лечения и реабилитации остается невысокой. Комплексная терапия при лечении нейродегенеративных заболеваний основана на использовании нейропептидов, выделенных из головного мозга крупного рогатого ско-

та. Ксеногенное происхождение препаратов существенно ограничивает эффективность их применения в связи с возможной вирусной контаминацией и выраженной иммуногенностью. Разработка ноотропных препаратов на основе индуцированных плюрипотентных клеток (ИПСК) человека, дифференцированных в нейральном направлении без использования компонентов ксеногенного происхождения является перспективным направлением для применения в терапии нейродегенеративных заболеваний.

Целью работы является разработка протокола направленной нейральной дифференцировки ИПСК в 3D системе для получения ноотропного препарата.

Для дифференцировки были использованы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (ИПСК), полученные из фибробластов человека путем трансдукции вирусными конструкциями на основе Сендай вируса, несущих факторы репрограммирования (Nanog, Sox2, c-Мyc и Klf-4). Плюрипотентность ИПСК клеток подтверждалась экспрессией транскрипционных факторов Oct4, Nanog, SSEA4, TRA-1-81. ИПСК культивировали на подложке из витронектина в среде E8 без использования компонентов животного происхождения.

ИПСК культивировали 7 дней на пластике с низкой адгезией в среде DMEM/F12 с добавлением реагентов B27, N2 и EGF для формирования эмбриоидных телец. Последующие этапы культивирования проводили в среде с добавлением FGF-2. Полученные нейральные стволовые клетки дифференцировали в среде без ростовых факторов в течение 14-28 дней. Морфологический анализ свидетельствовал о том, что нейросферы включают в себя клетки, находящиеся на различных стадиях нейральной/нейрональной дифференцировки. Преимущественно встречаются группы клеток, организованные в розетко-подобные структуры, а также зрелые нейроны и клетки глии. Методами ПЦР и иммуноцитохимии было показано наличие маркеров, характерных для разных стадий нейральной дифференцировки: Pax6, Foxp2, Nestin, Tubb3, Mar2, NSE, GFAP.

Выбранная методика позволяет получать нейральные/глиальные клетки в 3D- системе без использования компонентов животного происхождения в составе сыворотки или подложки. Такой протокол может быть использован для получения лекарственного препарата с ноотропным действием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.604.21.0184 RFMEFI60417X0184)

UDC 616.8

## DIRECTION NEURAL DIFFERENTIATION OF HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS IN A 3D-SYSTEM FOR OBTAINING A NOOTROPIC PREPARATION.

DI. Salikhova <sup>1</sup>, G.E. Leonov <sup>1</sup>, I.A. Fedyunina <sup>1</sup>, S.L. Kiselev <sup>1,2</sup>, T.B. Bukharova <sup>1</sup>, D.V. Goldshtein <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research center of medical genetics, Moskvorechie 1, Moscow, Russia 115522

<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Gubkina Str. 3, Moscow, Russia 119333  
 e-mail: diana\_salikhova@bk.ru

We developed a protocol for direction neural differentiation of human iPSC in a 3D- system without using the components of xenogenous origin to obtain a nootropic preparation.

**Key words:** neural differentiation of iPSC, neurospheres, nootropic preparation.

At the present days are observe the increase in diseases of the central nervous system of vascular, toxic, infectious and autoimmune genesis, but the methods of treatment and rehabilitation are low effective. The complex therapy in the treatment of neurodegenerative diseases are based on the use of neuropeptides isolated from the brain of cattle. The xenogeneic origin of the preparations significantly limits the efficiency of their use in connection with possible viral contamination and pronounced immunogenicity. The development of nootropic drugs based on a neural differentiation of the human induced pluripotent cells (iPSC) without using the components of xenogeneic origin is a promising direction for applying in the therapy of neurodegenerative diseases.

The aim of the work is to develop a protocol for directed neural differentiation of iPSC in a 3D-system for obtaining a nootropic preparation. For the neural differentiation were used the human induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from human fibroblasts by transduction the Sendai viral with the reprogramming factors (Nanog, Sox2, c-Myc and Klf-4). Pluripotency of iPSC cells were confirmed by the expression of transcription factors Oct4, Nanog, SSEA4, TRA-1-81. iPSC were cultivated in the essential E8 medium with the vitronectin coated dishes without using the components of animal origin.

iPSC were cultured for 7 days on low adhesion plastic in DMEM / F12 medium with the addition of reagents B27, N2 and EGF to form embryoid bodies. Subsequent stages of cultivation were carried out in a medium supplemented with FGF-2. The resulting neural stem cells were differentiated in medium without growth factors for 14-28 days. Morphological analysis was indicated that neurospheres include the cells at the different stages of neural/neuronal differentiation. There are the main groups of cells organized in rosette-like structures, as well as mature neurons and glial cells. The markers of different stages of neural differentiation was demonstrated using a real-time PCR and immunocytochemistry analysis, such as Pax6, Foxp2, Nestin, Tubb- $\beta$ III, Map2, NSE, GFAP.

The chosen method enables to obtain the neural/glial cells in the 3D system without using the components of animal origin in the serum or substrate. Such protocol can be used to produce a drug with a nootropic effect.

This work was financially supported by the The Ministry of Education and Science of the Russian Federation (project no. № 14.604.21.0184 RFMEFI60417X0184)

## РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В НЕЙРАЛЬНЫЕ С ПОМОЩЬЮ МАЛЫХ МОЛЕКУЛ

**Е.М. Самойлова, В.А. Кальсин, С.Л. Котова, В.П. Баклаушев**

*Федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия*

*115682, Москва, ул. Ореховый бульвар, д. 28*

*e-mail: samoyket@gmail.com*

Были получены клетки, фенотипически соответствующие нейральным прогениторам, экспрессирующие SOX2, Nestin, beta-III-tubulin, но гетерогенные по степени дифференцировки и не обладающие достаточной степенью выживаемости и уровнем пролиферации для длительного культивирования, что делает необходимым оптимизацию протокола репрограммирования.

**Ключевые слова:** индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, прямое репрограммирование, малые химические молекулы, нейральные стволовые клетки, нейральные прогениторные клетки.

Травматические повреждения центральной нервной системы являются довольно распространенными и крайне тяжелыми заболеваниями, которые значительно ухудшают качество жизни пациента, могут привести к инвалидности, а также являются источниками экономической нагрузки, как для самого пациента, так и для системы здравоохранения в целом. На данный момент кроме классических методов лечения активно развивается клеточная трансплантология для терапии этих заболеваний. Несмотря на использование различных типов клеток, не все из них обладают достаточным нейрорегенеративным потенциалом, а те, что обладают, например, нейральные стволовые (NSC) и нейральные прогениторные клетки (NPC), являются не доступными для аутологичной трансплантации. Что приводит к необходимости искусственного создания линий этих клеток методами трансдифференцировки.

До сих пор наиболее перспективными кандидатами для получения NSC и NPC считались индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSCs). Однако генетическая нестабильность и потенциальная туморогенность iPSCs делают их неприменимыми в клинике на данный момент и заставляют исследователей искать альтернативные более безопасные источники NPC для восстановления утраченных функций головного и спинного мозга и альтернативные протоколы репрограммирования клеток. Одним из таких источников может быть трансдифференцировка соматических клеток в нейральные с помощью коктейля малых молекул. Среди малых молекул выделяют условно вспомогательные вещества, подготавливающие процесс трансдифференцировки, так и молекулы, заменяющие по результирующему эффекту некоторые транскрипционные факторы. Целью данного исследования является создание протокола репрограммирования мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга взрослого человека с помощью малых молекул для создания NPC.

Для репрограммирования мМСК костного мозга и получения NPC был использован коктейль малых молекул, в который входили как «дестабилизирующие» молекулы, такие как, ингибиторы гистондеацетилазы, деметилирующие агенты, модуляторы цитоскелета, так и активаторы сигнальных путей (SHH). В результате были получены клетки, фенотипически соответствующие нейральным прогениторам, экспрессирующие SOX2, нестин, а также  $\beta$ III-тубулин. Исходя из анализа литературы и собственных экспериментальных данных, обсуждаются возможные модификации протокола.

Для репрограммирования мМСК костного мозга и получения NPC был использован коктейль малых молекул, в который входили как «дестабилизирующие» молекулы, такие как, ингибиторы гистондеацетилазы, деметилирующие агенты, модуляторы цитоскелета, так и активаторы сигнальных путей (SHH). В результате были получены клетки, фенотипически соответствующие нейральным прогениторам, экспрессирующие SOX2, нестин, а также βIII-тубулин. Исходя из анализа литературы и собственных экспериментальных данных, обсуждаются возможные модификации протокола.

*Литература:*

1. Chin M.H., Mason M.J., Xie W., et al. *Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures* // *Cell Stem Cell*. 2009; 5:111–123. 2. Zhao T., Zhang Z.N., Rong Z., Xu Y. *Immunogenicity of induced pluripotent stem cells* // *Nature*. 2011; 474:212–215. 3. Qin H., Zhao A., Fu X. *Small molecules for reprogramming and transdifferentiation* // *Cell Mol. Life Sci*. 2017 Oct; 74(19): 3553-3575. 4. Baranek M., Belter A., Naskręt-Barciszewska M.Z., et al. *Effect of small molecules on cell reprogramming* // *Mol. Biosyst*. 2017 Jan 31; 13(2):277-313. 5. Ahlfors J.-E., Elayoubi R. *New World Laboratories Inc. Methods for reprogramming cells and uses thereof* // *US 13/843,713*. 31

**Финансирование:** Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (грант No. 16-15-10432).

## REPROGRAMMING MESENCHYMAL STEM CELL INTO NEURAL CELLS USING SMALL MOLECULES

**E.Samoylova, V.Kalsin, S.Kotova, V.Baklaushev**

*Federal Research Clinical Center of the Federal Biomedical Agency of Russian Federation, Russia, 115682, Moscow, Orekhovy Blvd., 28*

We have obtained cells phenotypically corresponding to neural progenitors, expressing SOX2, Nestin, beta-III-tubulin, but heterogeneous by their degree of differentiation and lacking a sufficient degree of survival and level of proliferation for long culturing, which makes it necessary to optimize the reprogramming protocol.

**Key words:** induced pluripotent stem cell, direct reprogramming, small molecules, neural stem cells, neural progenitor cells

Traumatic injuries of the central nervous system are wide-spread and extremely severe conditions which essentially impair the patient's quality of life, may lead to disability and are also sources of economical burden, both for the patient and the healthcare in general. Besides the classical approaches to treatment, cell transplantology has been actively developed currently for the therapy of these diseases. In spite of application of different cell types, not all of them have a sufficient neuroregenerative potential, and those which do have it, e.g. neural stem cells (NSC) and neural progenitor cells (NPC), are not available for autologous transplantation. This fact stipulates the necessity of artificial creation of such cell lines via the transdifferentiation techniques.

So far, induced pluripotent stem cells (iPSCs) have been considered the most promising candidates for preparation of NSC and NPC. However, genetic instability and potential tumorigenicity of iPSCs make them inapplicable in the clinical practice for the present moment and compel researchers to search for alternative safer NPC sources for the restoration of the lost brain and spinal cord functions and alternative protocols of cells' reprogramming. Transdifferentiation of somatic cells into neural cells using a cocktail of small molecules may become one of such sources. Among the small molecules, auxiliary substances preparing the transdifferentiation process and molecules substituting some transcription factors by their resulting effect are conditionally distinguished. The aim of this study is the development of a protocol for reprogramming mesenchymal stem cells (MSC) from the adult human bone marrow using small molecules for NPC preparation.

To reprogram MSC from the bone marrow and prepare NPC, we used a cocktail of small molecules, which included both "destabilizing" molecules, such as histone deacetylase inhibitors, demethylating agents, cytoskeleton modulators and signaling pathway activators (SHH). As a result, we prepared cells phenotypically corresponding to neural progenitors, expressing SOX2, Nestin and beta-III-tubulin. Taking into account the literature analysis and our own experimental data, we discuss possible modifications of the protocol.

To reprogram MSC from the bone marrow and prepare NPC, we used a cocktail of small molecules, which included both "destabilizing" molecules, such as histone deacetylase inhibitors, demethylating agents, cytoskeleton modulators and signaling pathway activators (SHH). As a result, we prepared cells phenotypically corresponding to neural progenitors, expressing SOX2, Nestin and beta-III-tubulin. Taking into account the literature analysis and our

own experimental data, we discuss possible modifications of the protocol.

*References:*

1. Chin M.H., Mason M.J., Xie W., et al. *Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures* // *Cell Stem Cell*. 2009; 5:111–123. 2. Zhao T., Zhang Z.N., Rong Z., Xu Y. *Immunogenicity of induced pluripotent stem cells* // *Nature*. 2011; 474:212–215. 3. Qin H., Zhao A., Fu X. *Small molecules for reprogramming and transdifferentiation* // *Cell Mol. Life Sci*. 2017 Oct; 74(19): 3553-3575. 4. Baranek M., Belter A., Naskręt-Barciszewska M.Z., et al. *Effect of small molecules on cell reprogramming* // *Mol. Biosyst*. 2017 Jan 31; 13(2):277-313. 5. Ahlfors J.-E., Elayoubi R. *New World Laboratories Inc. Methods for reprogramming cells and uses thereof* // US 13/843,713. 31

**Grant:** The work was financially supported by the Russian Science Foundation, Grant No. 16-15-10432.

# БИОИНФОРМАТИКА И ИТ

## BIOINFORMATICS AND IT

### БОЛЬШИЕ МАССИВЫ ДАННЫХ В КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ

#### BIG DATA IN CLINICAL MEDICINE

1. АНАЛИЗ ТРЕХМЕРНЫХ ПАТТЕРНОВ, СВЯЗАННЫХ С ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ, Веселова Д.А., Карасев Д.А., Веселовский А.В., Соболев Б.Н. ....	525
ANALYSIS OF 3D PATTERNS RELATED TO ENZYME SPECIFICITY OF PROTEIN PHOSPHORYLATION, Veselova D.A., Karasev D.A., Veselovsky A.V., Sobolev B.N. ....	525
2. АССОЦИАЦИИ MIRNA И MRNA КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА, Пинский И.В., Лабейт Э., Лабейт Д., Иващенко А.Т. ....	526
ASSOCIATIONS OF MIRNAS AND CANDIDATE GENES OF HUMAN CARDIOVASCULAR DISEASES, Pinsky I.V., Labeit S., Labeit D., Ivashchenko A.T. ....	527
3. ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ MIRNA С mRNA ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА E2F, Айсина Д.Е., Ниязова Р.Е., Имянитов Е.Н., Иващенко А.Т. ....	528
FEATURES OF MIRNA BINDING WITH mRNA OF E2F FAMILY GENES, Aisina D.E., Niyazova R.E., Imyanitov E.N., I vashchenko A.T. ....	529
4. ПРОГРАММНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЭМОЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, Сидоров К.В., Филатова Н.Н. ....	530
A SOFTWARE PACKAGE FOR MONITORING HUMAN EMOTIONS, Sidorov K.V., Filatova N.N. ....	531
5. РАСПРЕДЕЛЁННАЯ ИНФРАСТРУКТУРА ДЛЯ БЕЗОПАСНОГО ХРАНЕНИЯ И СОВМЕСТНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДАННЫХ, Пономарев А.В. ....	532
FULLY DISTRIBUTED INFRASTRUCTURE ALLOWS SECURE STORAGE AND SHARING OF GENETICS DATA, Ponomarev A.V. ....	533
6. СВОЙСТВА ПОЛИСАЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ mRNA С mRNA ГЕНА ZFH3 И ЕГО ОРТОЛОГОВ, Кондыбаева А.М., Акимниязова А.Н., Каменова С.У., Иващенко А.Т. ....	534
THE PROPERTIES OF miRNA BINDING POLYSITES IN mRNA OF ZFH3 GENE AND ITS ORTHOLOGS, Kondybayeva A.M., Akimniyazova A.N., Kamenova S.U., Ivashchenko A.T. ....	535
7. СВОЙСТВА САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miR-1322-3p В mRNA ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ОРТОЛОГОВ, Юрикова О.Ю., Атамбаева Ш.А., Большой А., Иващенко А.Т. ....	536
PROPERTIES OF miR-1322-3p BINDING SITES IN mRNA OF HUMAN TARGET GENES AND T HEIR ORTHOLOGS, Yurikova O.Yu., Atambayeva Sh.A., Bolshoy A., Ivashchenko A.T. ....	538
8. СИСТЕМА МОНИТОРИНГА КОГНИТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ЭМОЦИОНАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА, К.В.Сидоров, Н.Н.Филатова, П.Д.Шемаев ....	538
A SYSTEM FOR MONITORING HUMAN COGNITIVE ACTIVITY AND EMOTIONAL REACTIONS, K.Sidorov, N.Filatova, P.Shemaev ....	539

УДК 577.112.5

## АНАЛИЗ ТРЕХМЕРНЫХ ПАТТЕРНОВ, СВЯЗАННЫХ С ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ

Веселова Д.А., Карасев Д.А., Веселовский А.В., Соболев Б.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), Россия, 119121, Москва, Погодинская, 10  
e-mail: darya.veselova.94@mail.ru

Компьютерное предсказание сайтов фосфорилирования применяется при исследовании регуляторных биологических процессов. Однако приемлемая точность предсказания на основе аминокислотных последовательностей достижима далеко не всегда. Привлечение данных об окружении фосфосайтов в трехмерных структурах белков позволит повысить точность прогноза.

**Ключевые слова:** компьютерное предсказание; фосфорилирование белков; трехмерная структура белка; паттерны ферментативной специфичности.

Фосфорилирование белков широко используется в биологических регуляторных процессах. Эта модификация катализируется ферментами, известными как протеинкиназы. Изучение пространственных характеристик, связанных с сайтами фосфорилирования, необходимо для того, чтобы повысить эффективность распознавания паттернов фосфорилирования в аминокислотных последовательностях белков. Используя данные о локализации фосфосайтов в аминокислотных последовательностях белков с известной трехмерной структурой, мы исследовали конформационную вариабельность окружения этих сайтов. Производился расчет расстояния между альфа-атомом углерода модифицируемого остатка и альфа-атомами окружающих аминокислотных позиций на основе атомных координат, представленных в базе данных PDB. Полученные результаты сопоставлялись в зависимости от типа модифицирующего фермента (семейства протеининазы). При анализе результатов, полученных для сайтов, модифицируемых исследуемыми типами протеинкиназ, наибольшая пространственная стабильность наблюдалась в пределах локальных фрагментов размером в пять остатков (по два с каждой стороны от сайта).

Полученные результаты будут использованы для выявления более точных паттернов фосфорилирования в аминокислотных последовательностях и при планировании дальнейших исследований в изучаемой области.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 гг.

UDC 577.112.5

## ANALYSIS OF 3D PATTERNS RELATED TO ENZYME SPECIFICITY OF PROTEIN PHOSPHORYLATION

Veselova D.A., Karasev D.A., Veselovsky A.V., Sobolev B.N.

Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russian Federation, 119121  
Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation, 117997  
Address for correspondence: 119121, Moscow, Pogodinskaya Street, 10, building 8  
e-mail: darya.veselova.94@mail.ru

Computer prediction of phosphorylation sites is used to study the regulatory biological processes. However, an acceptable accuracy of phosphosite prediction based on amino acid sequences is not always reached. Involvement of data on the phosphosite environments in 3D protein structures will allow an increase of the prediction accuracy.

**Key words:** computer prediction; protein phosphorylation; 3D protein structure; accuracy of prediction; patterns of enzyme specificity.

Protein phosphorylation is widely used in biological regulatory processes. This modification is catalyzed by enzymes known as protein kinases. The study of spatial features related to phosphorylation sites is necessary to improve the efficiency of recognition of the phosphorylation patterns in amino acid sequences of proteins.



Using the data on phosphosite locations in sequences of proteins whose 3D structure is known, we investigated the conformational variability of site environments. We calculated distances between the alpha carbon of the modifiable residue and alpha carbons of the surrounding amino acid positions based on the atom coordinates retrieved from the PDB database. The obtained results were compared depending on the modifying enzyme type (protein kinase family). When analyzing the results obtained for sites modified by the studied protein kinases types, the most spatial stability was observed within local fragments of five residues (two ones at both sides of the site). The obtained results will be used to establish the more accurate patterns of phosphorylation in the amino acid sequences and plan the further studies in the considered area.

The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013–2020.

УДК 577.21

## АССОЦИАЦИИ miRNA И mRNA КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Пинский И.В. <sup>1</sup>, Лабейт З. <sup>2</sup>, Лабейт Д. <sup>2</sup>, Иващенко А.Т. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан  
050040, Алматы, пр. аль-Фараби, 71  
e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

<sup>2</sup> Медицинский факультет Маннгейма университета Гейдельберга, Маннгейм, Германия  
68167, Маннгейм, Theodor-Kutzer Ufer 1-3

Выявлены ассоциации miRNA с кандидатными генами сердечно-сосудистых заболеваний, которые могут играть ключевую роль в развитии инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, атеросклероза и метаболического синдрома.

**Ключевые слова:** miRNA; mRNA; инфаркт миокарда; ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия; атеросклероз; метаболический синдром

В последние годы активно изучается регуляция экспрессии кандидатных генов различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, с помощью miRNA. miRNA по многим свойствам являются удобными и надежными молекулами, позволяющими объективно отражать происходящие в клетках метаболические и молекулярно-генетические процессы. Нами создана программа поиска сайтов связывания miRNA в mRNA генов, определяющая с высокой достоверностью ключевые количественные характеристики взаимодействия miRNA с mRNA в 5'-UTR, CDS и 3'-UTR [1]. Было изучено связывание 6271 miRNA человека с mRNA 74 кандидатных генов, которые, предположительно, могут быть биомаркерами и играть ключевую роль в развитии инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, атеросклероза и метаболического синдрома. Мы отобрали 438 сайтов связывания miRNA в mRNA этих генов с учётом свободной энергии связывания ( $\Delta G$ , кДж/моль) и длины miRNA. Больше всего сайтов связывания выявлено у кандидатных генов ишемической болезни сердца (155). Только четыре гена имели полностью комплементарные сайты связывания miRNA: TPM1, GATA5, NKX2-5 и F2. Наибольшее число сайтов связывания miRNA содержалось в mRNA генов GATA4, NKX2-5, TTN, LDLR и PPARGC1A. Выявлены ассоциации miRNA и mRNA кандидатных генов сердечно-сосудистых заболеваний, которые имели величину  $\Delta G$  более -130 кДж/моль. Ассоциации miR-19-44540-3p с mRNA гена ACTA2, miR-17-40081-5p с mRNA AST1, miR-4763-3p с mRNA гена MYL4, miR-15-35627-5p с mRNA гена TPM1 рекомендуются в качестве биомаркеров инфаркта миокарда. Ассоциации miR-7-21068-3p с mRNA гена GATA2, miR-2-3313-3p, miR-2-3313-3p, miR-3-8100-5p, miR-16-13062-5p, miR-1-155-3p с mRNA гена GATA4, miR-20-43102-5p с mRNA гена GATA5, miR-6-17815-3p с mRNA гена GATA6, miR-6789-5p и miR-6-16980-5p с mRNA гена HIF1A, miR-1273g-3p с mRNA гена ICAM1, miR-12-33610-3p, miR-9-20317-3p, miR-19-41910-5p с mRNA гена MAPK1, miR-19-21199-3p, miR-20-22562-3p, miR-2-3313-3p, miR-1-2121-3p с mRNA гена NKX2-5, miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p с mRNA гена PPARGC1A, miR-22-45834-5p с mRNA гена PYGB, miR-19-21199-3p, miR-1-2121-3p, miR-20-22562-3p, miR-19-33623-3p, miR-19-30988-5p, miR-3-8100-5p с mRNA гена VEGFB, miR-2-3313-3p, miR-15-32047-5p, miR-17-40081-5p, miR-20-45152-5p с mRNA гена VEGFC рекомендуются в качестве биомаркеров ишемической болезни сердца. Ассоциации miR-3-8100-5p с mRNA гена ACE1, miR-11-30672-3p с mRNA гена F2, miR-20-43102-5p с mRNA гена GATA5, miR-6-17815-3p с mRNA гена GATA6, miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p с mRNA гена PPARGC1A рекомендуются в качестве биомаркеров артериальной гипертензии. Ассоциации miR-1-1109-3p с mRNA гена ICAM1, miR-4-11316-5p с mRNA гена INSR, miR-619-5p с mRNA гена LDLR, miR-9-20317-3p, miR-9-20317-

3p, miR-5-15733-3p с mRNA гена PPARGC1A, miR-619-5p и miR-5095 с mRNA гена VDR, miR-9-20317-3p с mRNA гена VLDLR рекомендуются в качестве биомаркеров метаболического синдрома. Эти же ассоциации за исключением miR-4-11316-5p и гена INSR рекомендуются для диагностики атеросклероза. Концентрации предложенных для ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний miRNA и mRNA кандидатных генов легко контролируются в крови.

Литература:

1 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. *MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes*//Bioinformatics. 2014. Vol. 10. № 7. P. 423-427.

UDC 577.21

## ASSOCIATIONS OF MIRNAS AND CANDIDATE GENES OF HUMAN CARDIOVASCULAR DISEASES

Pinsky I.V. <sup>1</sup>, Labeit S. <sup>2</sup>, Labeit D. <sup>2</sup>, Ivashchenko A.T. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan  
050040, Almaty, Al-Farabi Avenue, 71  
e-mail: ilya.pinsky@mail.ru

<sup>2</sup> Medical Faculty Mannheim of the University of Heidelberg, Mannheim, Germany  
68167, Mannheim, Theodor-Kutzer Ufer 1-3

Associations of miRNAs and candidate genes of cardiovascular diseases are identified. These associations can play key role in the development of myocardial infarction, ischemic heart disease, arterial hypertension, atherosclerosis and metabolic syndrome

**Key words:** miRNA; mRNA; myocardial infarction; ischemic heart disease; arterial hypertension; atherosclerosis; metabolic syndrome

The regulation of different diseases' candidate gene expression, including cardiovascular diseases, by miRNAs is actively studied in the last years. miRNAs are reliable and suitable molecules by many properties because they allow to reflect objectively metabolic and molecular-genetic processes occurring in cells. We have created a program of searching miRNA binding sites in mRNAs of genes. This program determinates key quantitative characteristics of these sites in 5'-UTR, CDS and 3'-UTR [1]. The binding of 6271 human miRNAs with mRNAs of 74 candidate genes was studied. These genes, presumably, can be biomarkers and play a key role in the development of myocardial infarction, ischemic heart disease, arterial hypertension, atherosclerosis and metabolic syndrome and perform various functions. We have selected 438 miRNA binding sites in mRNAs of these genes, taking into account free binding energy ( $\Delta G$ , kJ/mole) and the length of miRNAs. The largest number of binding sites (155) is found in mRNAs of ischemic heart disease candidate genes. Only four genes had completely complementary miRNA binding sites in their mRNAs: TPM1, GATA5, NKX2-5 and F2. GATA4, NKX2-5, TTN, LDLR and PPARGC1A genes contained the largest number of miRNA binding sites in their mRNAs. Associations of miRNAs and mRNAs of candidate genes of human cardiovascular diseases, which had values of  $\Delta G$  more than -130kJ/mole, were found. Associations of miR-19-44540-3p and mRNA of ACTA2 gene, miR-17-40081-5p and mRNA of AST1 gene, miR-4763-3p and mRNA of MYL4 gene, miR-15-35627-5p and mRNA of TPM1 gene are recommended as biomarkers of myocardial infarction. Associations of miR-7-21068-3p and mRNA of GATA2 gene, miR-2-3313-3p, miR-2-3313-3p, miR-3-8100-5p, miR-16-13062-5p, miR-1-155-3p and mRNA of GATA4 gene, miR-20-43102-5p and mRNA of GATA5 gene, miR-6-17815-3p and mRNA of GATA6 gene, miR-6789-5p и miR-6-16980-5p and mRNA of HIF1A gene, miR-1273g-3p and mRNA of ICAM1 gene, miR-12-33610-3p, miR-9-20317-3p, miR-19-41910-5p and mRNA of MAPK1 gene, miR-19-21199-3p, miR-20-22562-3p, miR-2-3313-3p, mir-1-2121-3p and mRNA of NKX2-5 gene, miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p and mRNA of PPARGC1A gene, miR-22-45834-5p and mRNA of PYGB gene, miR-19-21199-3p, mir-1-2121-3p, miR-20-22562-3p, miR-19-33623-3p, miR-19-30988-5p, miR-3-8100-5p and mRNA of VEGFB gene, miR-2-3313-3p, miR-15-32047-5p, miR-17-40081-5p, miR-20-45152-5p and mRNA of VEGFC gene are recommended as biomarkers of ischemic heart disease. Associations of miR-3-8100-5p and mRNA of ACE1 gene, miR-11-30672-3p and mRNA of F2 gene, miR-20-43102-5p and mRNA of GATA5 gene, miR-6-17815-3p and mRNA of GATA6 gene, miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p and mRNA of PPARGC1A gene are recommended as biomarkers of arterial hypertension. Associations of miR-1-1109-3p and mRNA of ICAM1 gene, miR-4-11316-5p and mRNA of INSR gene, miR-619-5p and mRNA of LDLR gene, miR-9-20317-3p, miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p and mRNA of PPARGC1A gene, miR-619-5p and miR-5095 with mRNA of VDR gene, miR-9-20317-3p and mRNA of VLDLR gene

are recommended as biomarkers of metabolic syndrome. All these associations with exception of miR-4-11316-5p and mRNA of INSR gene are recommended for diagnostics of atherosclerosis. Concentrations of these miRNAs and mRNAs of candidate genes, suggested for early diagnostics of cardiovascular diseases, are easy controlled in the blood.

*References:*

1 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes//Bioinformatics. 2014. Vol. 10. № 7. P. 423-427.

УДК 577.21

## ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ miRNA С mRNA ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА E2F

Айсина Д.Е. <sup>1</sup>, Ниязова Р.Е. <sup>1</sup>, Имянитов Е.Н. <sup>2</sup>, Иващенко А.Т. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ Проблем биологии и биотехнологии, КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия 050038, Алматы, Проспект аль-Фараби, д. 71, корп. 6  
 e-mail: dana.aisina03@gmail.com

Установлены характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов семейства транскрипционных факторов E2F. Сайты связывания miRNA расположены в 5'UTR, CDS и 3'UTR. mRNA ортологичных генов E2F1-E2F8 содержат сайты связывания miRNA многих видов животных, что свидетельствует о раннем возникновении регуляции экспрессии этих генов посредством miRNA.

**Ключевые слова:** miRNA, mRNA, E2F гены, ортологичные гены, онкогенез.

Белки семейства E2F регулируют экспрессию генов клеточного цикла, апоптоза и участвуют в онкогенезе. Участие E2F в онкогенезе определяет необходимость изучения особенностей связывания miRNA с mRNA генов семейства E2F. Нуклеотидные последовательности mRNA генов человека и ортологичных генов загружены из NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нуклеотидные последовательности 2565 miRNA человека взяты из базы данных miRBase (<http://mirbase.org>), а 3701 miRNA заимствованы из публикации [1]. Сайты связывания miRNA предсказывали с использованием программы MirTarget [2]. 22 miRNA связываются с mRNA гена E2F1, из которых десять связываются в 5'UTR, восемь - в CDS и четыре - в 3'UTR. Установлено наличие сайтов связывания для miR-20-23817 в CDS mRNA ортологичных генов E2F1. Нуклеотидные последовательности сайтов связывания miR-20-23817-3p кодируют октапептид PAAPAAGP, который сохраняется у 17 видов млекопитающих. Ген E2F2 имеет сайты связывания только для восьми miRNA, расположенные в 3'UTR и CDS. Гептапептид TPHGPEG, кодируемый сайтом связывания miR-760-3p, консервативен у 18 видов млекопитающих. mRNA гена E2F3 имеет сайты связывания для 30 miRNA. miR-7-19239-3p связывается в 5'UTR, miR-1-2558-3p и miR-5-16871-5p в 3'UTR, а другие miRNA в CDS. mRNA гена E2F3 имеет множественные сайты связывания для 15 miRNA в CDS. Сайт связывания miR-19-42593-3p кодирует олигопептид AAVVAAAAA, который является высоко консервативным в белке E2F3 12 видов млекопитающих. Ген E2F4 содержит сайты связывания для шести miRNA в 5'UTR, CDS и 3'UTR. miR-1322 имеет множественные сайты связывания в mRNA ортологичных генов E2F4, кодирующих полипептид SSSSSSSSSNSNSSSSS разной длины, в зависимости от вида млекопитающих. mRNA гена E2F5 имеет сайты связывания для восьми miRNA, расположенные в CDS. Гептапептид LLQEAKD, кодируемый сайтом связывания miR-6791-3p, консервативен у 19 видов млекопитающих. miR-18-39953-5p в mRNA гена E2F5 кодирует консервативный октапептид GGAGGGSS. mRNA гена E2F6 имеет сайты связывания в 5'UTR и 3'UTR. Участки связывающие miR-19-43065-3p полностью гомологичны у Homo sapiens, Pan troglodytes, Nomascus leucogenys, Pan paniscus. Сайт связывания miR-14-34881-3p полностью гомологичен в mRNA гена E2F7 H. sapiens, Rhinopithecus roxellana, Chlorocebus sabaeus, P. paniscus, а в mRNA остальных видов имеется только одна замена нуклеотидов. Три miRNA, связывающиеся с mRNA гена E2F8, имеют множественные сайты связывания, расположенные в 3'UTR. miR-3-5147-5p имеет девять сайтов связывания в mRNA гена E2F8, miR-101-27078-5p связывается в семи сайтах, miR-574-5p имеет четыре сайта связывания в mRNA гена E2F8.

Полученные результаты показывают, что мРНК семейства генов E2F могут связываться с miRNA в разной степени. Наибольшее количество сайтов связывания показано для генов E2F1, E2F2, E2F3. Сайты связывания в mRNA ортологичных генов E2F1-E2F8 кодируют олигопептиды, которые являются консервативными у разных видов. На основании полученных данных определены ассоциации miRNA-mRNA, позво-

ляющие использовать их в качестве диагностических маркеров для рака различной локализации.

Литература:

1. Londin E. et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs // *PNAS*. - 2015. - P. E1106-E1115.
2. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // *Bioinformatics*. - 2014. - Vol.10. - N7. - P. 423-427.

UDC 577.21

## FEATURES OF MIRNA BINDING WITH MRNA OF E2F FAMILY GENES

Aisina D.E. <sup>1</sup>, Niyazova R.E. <sup>1</sup>, Imyanitov E.N. <sup>2</sup>, Ivashchenko A.T. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Problems of Biology and Biotechnology, al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Petrov, St. Petersburg, Russia  
050038, Almaty, Prospect al-Farabi, 71, korp.6  
e-mail: dana.aisina03@gmail.com

Search of binding sites of 6266 miRNA with mRNA of genes of E2F transcription factors family was implemented. miRNA binding sites are located in 5'UTRs, CDSs and 3'UTRs. mRNAs of orthologous E2F1-E2F8 genes contain miRNA binding sites in many animal species, that is an evidence of early regulation of these genes expression by miRNA.

**Key words:** miRNA, mRNA, E2F genes, orthologous gene, oncogenesis.

Proteins of the E2F family regulate the expression of the cell cycle genes, checkpoints, apoptosis proteins and are involved in oncogenesis. A wide range of E2F family participation in oncogenesis determines the necessity to explore features of miRNA binding with mRNAs of E2F family genes. The nucleotide sequences of mRNAs of human genes and orthologous genes were downloaded from NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Nucleotide sequences of human 2565 miRNAs were downloaded from the miRBase database (<http://mirbase.org>). 3701 miRNAs nucleotide sequences were taken from the publication [1] and were listed with our notation. miRNAs binding sites were predicted using the MirTarget program [2].

22 miRNAs bind with mRNAs of E2F1 gene. Ten miRNAs of them bind in the 5'UTRs, eight miRNAs - in the CDSs and four miRNAs in the 3'UTRs. The presence of binding sites for miR-20-23817 in the CDSs of mRNAs of orthologs of E2F1 genes have been established. The nucleotide sequences of miR-20-23817-3p binding sites encodes PAAPAAGP octapeptide which conserved in 17 mammalian species. E2F2 gene has binding sites only for eight miRNAs. Binding sites are located in 3'UTRs and CDSs. TPHGPEG heptapeptide, encoded by miR-760-3p binding site, conservative in 18 mammalian species. mRNAs of E2F3 gene have binding sites for 30 miRNAs. miR-7-19239-3p binds in the 5'UTR, miR-1-2558-3p and miR-5-16871-5p bind in the 3'UTR and other miRNAs bind in the CDS of mRNA. mRNAs of E2F3 gene have multiple binding sites for 15 miRNAs in the CDS. Binding site of miR-19-42593-3p encodes AAVVAAAAA oligopeptide, which is highly conserved in the protein E2F3 of 12 species of mammals. E2F4 gene contains binding sites for six miRNAs in the 5'UTR, CDS and 3'UTR. miR-1322 has multiple binding sites in mRNA of E2F4 orthologous gene encoded SSSSSSSSSSSNSNSSSSSS polypeptide with varying length depending on the mammalian species. mRNA of E2F5 gene has binding sites for eight miRNAs, located in the CDS. LLQEAKD heptapeptide, encoded by miR-6791-3p binding site, conservative in 19 mammalian species. miR-18-39953-5p binding site in mRNAs of E2F5 gene encodes the conservative octapeptide GGAGGGSS. mRNA of E2F6 gene has binding sites in 5'UTR and 3'UTR. Binding sites of miR-19-43065-3p are completely homologous in Homo sapiens (Has), Pan troglodytes (Ptr), Nomascus leucogenys (Nle), Pan paniscus (Ppa) and there is only one nucleotide replacement in other species. The binding site of miR-14-34881-3p is completely homologous in Hsa, Rhinopithecus roxellana (Rro), Chlorocebus sabaeus (Csa), Pan mRNA of E2F7 gene and remaining species have only one substitution of nucleotides. Three miRNA, binding to mRNA of E2F8 gene have multiple binding sites located in the 3'UTR. miR-3-5147-5p has nine binding sites in mRNA of E2F8 gene, miR-101-27078-5p binds in seven sites, miR-574-5p has four binding sites in mRNA of E2F8 gene.

The obtained results indicate that mRNAs of E2F family genes can bind to miRNAs in different degrees. The largest number of miRNA binding sites was shown for mRNA of E2F1, E2F2, E2F3 genes. Binding sites in mRNA of orthologous genes of E2F1-E2F8 encode oligopeptides which are conserved in different species. Based on the obtained data, miRNA-mRNA associations have been identified, that allows them to be used as diagnostic markers for cancer of different localization.

References:

1. Londin E. et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs // PNAS. - 2015. - P. E1106-E1115.
2. Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformation. - 2014. - Vol.10. - N7. - P. 423-427.

УДК 004.81+004.93

## ПРОГРАММНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ МОНИТОРИНГА ЭМОЦИЙ ЧЕЛОВЕКА

Сидоров К.В., Филатова Н.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия  
 170026, Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22  
 e-mail: bmsidorov@mail.ru

Рассмотрен программный комплекс, предназначенный для мониторинга эмоций человека посредством анализа паттернов ЭЭГ и образцов речевых сигналов, зарегистрированных при помощи разнотипных инструментальных биосенсоров.

**Ключевые слова:** эмоция, эмоциональное состояние, мониторинг эмоций, ЭЭГ, речевые сигналы, аттрактор, программный комплекс.

В настоящее время зарубежными и российскими компаниями (Microsoft, Apple, NeuroSky, Sony, MacroTect Technology, Emotive Systems, Sound Intelligence, Центр речевых технологий, Медиком МТД, Нейрософт, Нейроматикс, РусБИТех), а также научно-исследовательскими и образовательными учреждениями (Massachusetts Institute of Technology, Queen Mary University of London, Tatung University, University of Toronto, RMIT University, University of Twente, ЮФУ, ВолгГТУ, ТПУ, ТвГТУ, МГТУ им. Н.Э. Баумана, ИВНД И НФ РАН, ИПУ РАН) ведется разработка и внедрение программно-инструментальных комплексов и информационно-измерительных систем, предназначенных для контроля и мониторинга эмоций человека посредством интерпретации биомедицинских сигналов (речевых сигналов; видеофрагментов мимики, поз и/или жестов; ЭЭГ, ЭМГ, ЭКГ, ЭОГ, КГР и др.) [1].

В работе приведено описание программного комплекса «EEG/S», предназначенного для мониторинга эмоционального состояния человека. При разработке и настройке комплекса задействованы математические аппараты нечетких множеств и нелинейной динамики.

Использование комплекса «EEG/S» позволило создать мультимодальную базу эмоций (MDB) с достоверными образцами двух типов биомедицинских сигналов (ЭЭГ и речевых сигналов), зарегистрированных с применением аудиовизуальной и обонятельной стимуляции. Выборки образцов речи и паттернов ЭЭГ из базы MDB применены при создании базы продукционных правил и разработке математической модели для интерпретации уровня и валентности эмоциональных состояний человека. При построении базы продукционных правил использовалась гибридная нейросетевая модель, которая реализована в пакете MATLAB и на языке C# 3.0 для среды исполнения .NET Framework 3.5 и выше. Созданная нейросетевая модель интегрирует стратегии механизма нечеткого вывода и нейроподобной иерархической структуры, а также демонстрирует связи по признакам реконструированных аттракторов [2] в полученных описаниях объектов, характеризующих различные классы эмоций. Разработанный на основе подобной структуры интерпретатор эмоций, будет относиться к типу систем, обучаемых с учителем. Это позволяет работать с объектами, которые задаются дискретными признаками и в дальнейшем последовательно переводятся в лингвистическую шкалу.

Тестирование программного комплекса проведено на базе Тверского государственного технического университета. В качестве испытуемых выступили студенты, аспиранты, преподаватели и научные сотрудники, имеющие возрастные и гендерные отличия. По результатам исследований получены значения с высокой достоверностью и точностью автоматической интерпретации уровня и валентности эмоций испытуемых (расхождение между интерпретацией по паттернам ЭЭГ и образцам речи для каждого человека не превышает 5 %).

Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям в рамках научного проекта «Разработка программного комплекса для мониторинга эмоционального состояния человека по речевым сигналам и электроэнцефалограммам» по договору № 10962ГУ/2016 от 10.02.2017 г.

Литература:

1. Филатова Н.Н., Сидоров К.В. Компьютерные модели эмоций: построение и методы исследования. – Тверь: Тверской государственный технический университет, 2017. – 200 с.
2. Филатова Н.Н., Сидоров К.В. Интерпретация характеристик эмоций с помощью анализа аттракторов, реконструированных по ЭЭГ-сигналам // Нечеткие системы и мягкие вычисления. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 57–76.

UDC 004.81+004.93

## A SOFTWARE PACKAGE FOR MONITORING HUMAN EMOTIONS

Sidorov K.V., Filatova N.N.  
Tver State Technical University, Tver, Russia  
170026, Russia, Tver, Afanasy Nikitin Emb. 22  
e-mail: bmisidorov@mail.ru

The paper considers a software package for monitoring human emotions by analyzing EEG patterns and samples of speech signals recorded using various instrumental biosensors.

**Key words:** emotion, emotional state, emotions monitoring, EEG, speech signals, attractor, software package.

Nowadays foreign and Russian companies (Microsoft, Apple, NeuroSky, Sony, Macrotellect Technology, Emotive Systems, Sound Intelligence, Speech Technology Center, Medicom MTD, Neurosoft, Neuromatix, RusBITech), as well as research institutes and educational institutions (Massachusetts Institute of Technology, Queen Mary University of London, Tatung University, University of Toronto, RMIT University, University of Twente, Southern Federal University, Volgograd State Technical University, Tomsk Polytechnic University, Tver State Technical University, Moscow State Technical University, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of RAS, Institute of Control Sciences of RAS) develop and implement software tool suites and information-measuring systems to control and monitor human emotions by interpreting biomedical signals (speech signals; video fragments facial expressions, postures and/or gestures; EEG, EMG, ECG, EOG, GSR et al.) [1].

The study describes a software package called EEG/S designed for monitoring human emotional state. Package development and tuning up involves mathematical apparatus of fuzzy sets and nonlinear dynamics.

The use of the EEG/S complex allowed creating a multimodal base of emotions (MDB) with reliable samples of two types of biomedical signals (EEG and speech signals), which were recorded using audiovisual and olfactory stimulation. The samples of speech and EEG patterns from the MDB were used when creating a database of production rules and developing a mathematical model for interpreting a level and valence of human emotional states. When building the base of production rules, the authors used a hybrid neural network model, which is implemented in the MATLAB package and in C# 3.0 for the .NET Framework 3.5 and later. The created neural network model integrates the strategies of a fuzzy inference mechanism and a neural-like hierarchical structure. It also shows connections by the characteristics of reconstructed attractors [2] in the received descriptions of objects characterizing different classes of emotions. The interpreter of emotions, which is based on this structure, will refer to the type of systems taught with a teacher. It allows working with objects specified by discrete characters, which then subsequently translated into a linguistic scale.

The Tver State Technical University has become base for testing the software package. Students, post-graduates, teachers and researchers with age and gender differences were testees. The research results gave values with high reliability and accuracy of automatic interpretation of testees' emotional level and valence (the discrepancy between interpretation by EEG patterns and speech samples for each person does not exceed 5 %).

The research was financially supported by the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises under the scientific project "Development of a software package for monitoring human emotional state by speech signals and electroencephalograms" by the contract no. 10962GU/2016 dated February 10, 2017.

References:

1. Filatova N.N., Sidorov K.V. *Kompyuternye modeli emotsy: postroenie i metody issledovaniya* [Computer models of emotions: construction and methods of research]. Tver, Russia, Tver State Technical University, 2017, 200 p. (in Russ.)
2. Filatova N.N., Sidorov K.V. *Interpretation of the emotion characteristics through the analysis of attractors reconstructed on EEG signals. Nечеткие Системы i Myagkie Vychisleniya* [Fuzzy Systems and Soft Computing]. 2016, vol. 11, no. 1, pp. 57–76 (in Russ.)

УДК 004.75:57.087.1

## ПОЛНОСТЬЮ РАСПРЕДЕЛЕННАЯ ИНФРАСТРУКТУРА ПОЗВОЛЯЕТ БЕЗОПАСНОЕ ХРАНЕНИЕ И РАЗДЕЛЕНИЕ ДАННЫХ О ГЕНЕТИКЕ

**Пономарев А.В.**

Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre, Ванкувер, Канада  
 V5Z 4S6, Канада, Британская Колумбия, Ванкувер, Запад 7-я авеню, д. 570 e-mail: andrew.ponomarev@gmail.com

Распределённая инфраструктура для геномики - децентрализованная платформа национального уровня, реализующая единые стандарты федеративного доступа и анализа локально контролируемых данных.

**Ключевые слова:** кибер-инфраструктура, распределенные данные, геномика

Возрастающий объём данных генетических исследований создаёт новые проблемы и возможности не только в технической, но и в правовых и морально-этических сферах. Текущая оценка динамики секвенирования ДНК в рамках программ здравоохранения показывает, что к 2025 году 60 миллионов новых геномов будут доступны в цифровом виде, в том числе 450 тысяч в Российской Федерации [1]. Предложенные ранее облачные сервисы не решают проблем дублирования больших объёмов информации и обеспечения конфиденциальности при хранении и доступе к персональной информации [2]. Федеративный доступ подразумевает доступ к данным для анализа без непосредственного копирования данных. Создание распределённой инфраструктуры для геномики позволит обеспечить федеративный доступ и анализ локально контролируемых данных.

Данный кибер-инфраструктурный проект позволит объединить основных поставщиков данных секвенирования, соблюдая при этом требования к стандартам конфиденциальности персональной информации между различными юрисдикциями [3]. Это значительно увеличит объём информации, доступной для анализа ученым-генетикам, занятым в сфере здравоохранения, а создание новых инструментов и аналитических решений позволит гармонизировать результаты генетических исследований.

Доступ к данным будет осуществляться посредством программного интерфейса приложения (API) с соответствующим аудитом действий и контролем доступа. Это позволит учёным проверять гипотезы на большом объёме выборки без непосредственного копирования данных, экономя при этом вычислительные ресурсы. Используя федеративный доступ можно будет выявлять связанный однонуклеотидный полиморфизм в конкретных генах, производить количественный анализ экспрессии генов отдельных транскрипций и валидировать ассоциации [4]. Данный подход уже используется в проектах персональной медицины в Australian Genomics, Genomics England и многих других странах.

Децентрализованная платформа национального уровня, реализующая единые стандарты, позволит совместно использовать геномные данные и сотрудничать в глобальном масштабе, продвигая исследования генома. Это означает более тесное сотрудничество между исследовательскими лабораториями и клиниками на территории РФ, а также участие в мировых проектах, таких как BRCA Challenge, Matchmaker Exchange и Beacon Project.

### Литература:

1. Ewan B., Jessica V., Peter G. Genomics in healthcare: GA4GH looks to 2022 // *bioRxiv*. - 2017. - No 203554. doi:10.1101/203554
2. Dove E.S., Joly Y., Tassé A.-M., et al. Genomic cloud computing: legal and ethical points to consider // *European Journal of Human Genetics*. - 2015. - No 23(10). - p. 1271-1278. doi:10.1038/ejhg.2014.196.
3. Angela P., Dixie B., Martin B., et al. A federated ecosystem for sharing genomic, clinical data // *Science*. - 2016. - No 352 (6291). - p. 1278-1280.
4. Constable S.D., Tang Y., Wang S., Jiang X., Chapin S. Privacy-preserving GWAS analysis on federated genomic datasets // *BMC Medical Informatics and Decision Making*. - 2015;15(Suppl 5):S2. doi:10.1186/1472-6947-15-S5-S2.

UDC 004.75:57.087.1

## FULLY DISTRIBUTED INFRASTRUCTURE ALLOWS SECURE STORAGE AND SHARING OF GENETICS DATA

**Ponomarev A.V.**

Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre, Vancouver, Canada 570 W 7th Ave, Canada, British Columbia, Vancouver, BC V5Z 4S6 e-mail: [andrew.ponomarev@gmail.com](mailto:andrew.ponomarev@gmail.com)

Fully distributed infrastructure for genomics is a nation-scale decentralized system implementing standards for the federated access and analysis of locally-controlled data.

**Key words:** cyber-infrastructure, distributed data, genomics

A growing amount of data coming from genetics research creates new technical challenges, and simultaneously raises legal, moral and ethical questions. The current estimation of healthcare-funded DNA analysis showed that 60 million new genomes would be sequenced by 2022, including 450 thousand in the Russian Federation [1]. Right now, each lab has their own analytical pipelines and file formats to process and store genomics data which complicates interoperability. Proposed cloud solutions do not solve issues of copying a large amount of data and ensuring confidentiality while storing and providing access to the personal genomics data [2]. Federated analysis implicits data access for distributed analysis without physically sharing it. Creation of distributed infrastructure for genomics will provide a federated access and analysis of locally-controlled data in a standardized way.

This cyber-infrastructure project will consolidate sequencing efforts across multiple centers, fulfilling security requirements of confidentiality of personal information among jurisdictions [3]. It will significantly extend the available amount of data for researchers working in the field of genomics driven healthcare. New tools and analytical pipelines will help to harmonize genetics research outcomes.

All data access will be through Application Programming Interfaces (APIs) with appropriate logging and security measures. This will allow scientists to test their hypotheses on larger genomic datasets without having to dedicate time and compute resources copying and storing data locally. Federated access could be used for joint variant calling in separate genes, analysis of differential gene expression of specific transcripts, and validation of associations [4]. This approach is already being used in large-scale personalized healthcare programs run by Australian Genomics, Genomics England, and many others.

Same standards across distributed national-scale platform will allow shared access to genomics data and promote genomic research by facilitating data analysis on a global scale. This means closer cooperation between research laboratories and clinics on the territory of the Russian Federation, as well as participation in world projects such as BRCA Challenge, Matchmaker Exchange, and Beacon Project.

### References:

1. Ewan B., Jessica V., Peter G. *Genomics in healthcare: GA4GH looks to 2022* // *bioRxiv*. - 2017. - No 203554. doi:10.1101/203554
2. Dove E.S., Joly Y., Tassé A.-M., et al. *Genomic cloud computing: legal and ethical points to consider* // *European Journal of Human Genetics*. - 2015. - No 23(10). - p. 1271-1278. doi:10.1038/ejhg.2014.196.
3. Angela P., Dixie B., Martin B., et al. *A federated ecosystem for sharing genomic, clinical data* // *Science*. - 2016. - No 352 (6291). - p. 1278-1280.
4. Constable S.D., Tang Y., Wang S., Jiang X., Chapin S. *Privacy-preserving GWAS analysis on federated genomic datasets* // *BMC Medical Informatics and Decision Making*. - 2015;15(Suppl 5):S2. doi:10.1186/1472-6947-15-S5-S2.



УДК 577.21

## СВОЙСТВА ПОЛИСАЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ mRNA С mRNA ГЕНА ZFHX3 И ЕГО ОРТОЛОГОВ

Кондыбаева А.М. <sup>1</sup>, Акимниязова А.Н. <sup>2</sup>, Каменова С.У. <sup>1</sup>, Иващенко А.Т. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Алматы, Казахстан*

<sup>2</sup> *Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан, e-mail: a\_ivashchenko@mail.ru*

Выявлены полисайты связывания различных miRNA в mRNA гена ZFHX3 и его ортологов, которые кодируют полиGlu, полиAla, полиPro, полиGly, полиGln. Эти полипептиды в ортологичных белках ZFHX3 фланкированы консервативными олигопептидами.

**Ключевые слова:** miRNA, mRNA, ген ZFHX3, олигопептиды ZFHX3, инсульт.

При инсульте выявлено много генов, которые рассматриваются в качестве кандидатных генов определяющих различные субтипы инсульта. К их числу относится ген ZFHX3, который кодирует транскрипционный фактор участвующий в регуляции экспрессии многих генов. Нарушения экспрессии гена ZFHX3 выявлены при инсульте, атеросклерозе и других сердечно-сосудистых заболеваниях. В белке ZFHX3 имеются различные олигопептиды которые кодируются повторами тринуклеотидов (ПТН). Предполагается, что изменение количества ПТН являются причиной заболеваний, однако их биологическая функция не установлена. Нуклеотидные последовательности miRNA брали из базы miRBase (<http://mirbase.org>) и статьи Londin E., et al. [1]. Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA находили по программе MirTarget.

Нами показано, что ПТН являются сайтами связывания различных miRNA. Первый ПТН в mRNA гена ZFHX3 человека состоит из семи последовательно расположенных сайтов связывания miR-12-32603-3p, кодирующих полиGlu. В белке ZFHX3 человека полиGlu содержит 30 аминокислот. В ортологичных белках 36 животных длина полиGlu изменялась от 27 Glu (*Pan paniscus*) до 33 Glu (*Balaenoptera acutorostratas*). Отрицательно заряженный полиGlu вероятно взаимодействует с положительно заряженными белками связанными с ДНК. Следующий участок mRNA гена ZFHX3 содержит сайты связывания miR-17-39416-3p, miR-5-15733-3p, miR-9-20317-3p, которые кодируют полиAla длиной 15 Ala. В 33 ортологичных белках ZFHX3 полиAla имел одинаковую длину. Участок miRNA гена ZFHX3 человека с полисайтом связывания miR-1322-3p кодирует полиGln, который состоял из 19 Gln. В 41 ортологах белка ZFHX3 длина полиGln изменялась от семи Gln (*Chelonia mydas*, *Lipotes vexillifer*) до 23 Gln (*Camelus ferus*, *Pseudopodoces humilis*). Сайты связывания miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p и miR-19-43437-5p расположены с наложением нуклеотидных последовательностей, которые при равной длине кодировали гептапептид PPPPPP. ПолиPro в белке человека состоял из 12 Pro. У ортологов ПолиPro содержал от 10 Pro (*Lipotes vexillifer*) до 14 Pro (*Loxodonta africana*). Сайты связывания miR-17-39416-3p, miR-9-20317-3p, miR-1-1819-3p, miR-5-15733-3p, miR-6-17815-3p, miR-18-39953-5p, miR-2-6862-5p, miR-1260b и miR-X-48174-3p кодировали у ZFHX3 человека полиGly длиной 22 Gly. Двенадцать сайтов связывания miR-17-39416-3p кодировали октапептиды GGGGGGSG, GGGGSGGG, GSGGGGGG, GSGGGGGG, SGGGGGGG и семь октапептидов GGGGGGGG. В 28 ортологах ZFHX3 длина полиGly уменьшалась до 11 Gly (*Balaenoptera acutorostratas*). В участке с 10798 нт по 10890 нт в mRNA гена ZFHX3 человека были последовательно расположены три сайта связывания miR-1322-3p разделенных кодонами для трипептида RQL и дипептида KV. В mRNA гена ZFHX3 человека эти три сайта кодировали 15 Gln. В белке ZFHX3 51 видов животных эти сайты связывания miR-1322-3p кодировали большее число Gln. У *Rattus norvegicus* и *Peromyscus maniculatus* полиGln состоял из 38 и 37 Gln, соответственно. Все полисайты связывания miRNA фланкировались консервативными нуклеотидными последовательностями, что отражалось в консервативности фланкирующих олигопептидов полиGlu, полиAla, полиPro, полиGly, полиGln. Участки ПТН могут одновременно связывать несколько miRNA, что увеличивает зависимость экспрессии генов от miRNA. 2D структура полинуклеотидов сайтов связывания в mRNA способствует связыванию miRNA благодаря слабым внутримолекулярным взаимодействиям нуклеотидов этого участка mRNA. Наложение сайтов связывания разных miRNA в mRNA гена ZFHX3 является компактной мишенью для нескольких miRNA, которые конкурируют между собой за сайт связывания.

*Литература:*

1. Londin E., et al. *Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific miRNAs*//*Proc.Nat.Acad.Sc.USA. 2015. Vol.112. N10. P.1106-1115.*

UDC 577.21

## THE PROPERTIES OF MIRNA BINDING POLYSITES IN MRNA OF ZFHX3 GENE AND ITS ORTHOLOGS

Kondybayeva A.M. <sup>1</sup>, Akimniyazova A.N. <sup>2</sup>, Kamenova S.U. <sup>1</sup>, Ivashchenko A.T. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup> Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan,  
e-mail: a\_ivashchenko@mail.ru

It was identified binding polysites of various miRNAs in mRNA of ZFHX3 gene and its orthologs, which encode polyGlu, polyAla, polyPro, polyGly, polyGln. These polypeptides of orthologous proteins ZFHX3 flanked by conservative oligopeptides.

**Key words:** miRNA, mRNA, ZFHX3 gene, ZFHX3 oligopeptides, stroke.

Many genes have been identified in stroke, which are considered as candidate genes determining various subtypes of stroke. These include the ZFHX3 gene, which encode the transcription factor involved in the regulation of the expression of many genes. Disruption in ZFHX3 gene expression was identified in stroke, atherosclerosis and other cardiovascular diseases. ZFHX3 protein contains different oligopeptides encoded by trinucleotide repeats (TNR). It is assumed that the change in the number TNR is the cause of the diseases, but their biological function is not established. The nucleotide sequences of miRNA were taken from miRBase database (<http://mirbase.org>) and article Londin E., et al. [1]. The characteristics of the miRNA interaction with mRNA were identified by MirTarget software.

We have shown that TNR are the binding sites of various miRNA. The first TNR in the mRNA of the human ZFHX3 gene consists of seven consecutive miR-12-32603-3p binding sites encoding polyGlu. In the human, polyGlu of ZFHX3 protein contains 30 amino acids. In orthologous proteins of 36 animals the length of polyGlu changed from 27 Glu (Pan paniscus) to 33 Glu (Balaenoptera acutorostratas). Negatively charged polyGlu probably interacts with positively charged DNA-binding proteins. The next region of the mRNA of ZFHX3 gene contains the binding sites for miR-17-39416-3p, miR-5-15733-3p, miR-9-20317-3p, which encode polyAla by 15 Ala length. In 33 ZFHX3 orthologous proteins polyAla have the same length. The region of ZFHX3 gene in human with binding polysite of miR-1322-3p encodes polyGln, which consisted of 19 Gln. In 41 orthologous proteins of ZFHX3 the length of polyGln varied from seven Gln (Chelonia mydas, Lipotes vexillifer) to 23 Gln (Camelus ferus, Pseudopodoces humilis). The binding sites of miR-2-6184-3p, miR-5-14114-5p and miR-19-43437-5p located with imposition of nucleotide sequences, which, for an equal length, encoded the heptapeptide PPPPPPP. PolyPro in a human protein consisted from 12 Pro. Orthologous polyPro contains from 10 Pro (Lipotes vexillifer) to 14 Pro (Loxodonta africana). The binding sites for miR-17-39416-3p, miR-9-20317-3p, miR-1-1819-3p, miR-5-15733-3p, miR-6-17815-3p, miR-18-39953-5p, miR-2-6862-5p, miR-1260b and miR-X-48174-3p of ZFHX3 in human encode polyGly by 22 Gly lengths. The twelve binding sites for miR-17-39416-3p encode octapeptides GGGGGGSG, GGGGSGGG, GGS GGGGG, GSGGGGG, SGGGGGG and seven octapeptides GGGGGGGG. In 28 orthologs of ZFHX3 the length of polyGly decreased to 11 Gly (Balaenoptera acutorostratas). In the region from 10798 nt to 10890 nt in mRNA of ZFHX3 gene of human was consequentially located three binding sites for miR-1322-3p separated by codons for RQL tripeptide and for KV dipeptide. In mRNA of ZFHX3 gene of human this three sites encoded 15 Gln. In ZFHX3 protein of 51 species of animals this miR-1322-3p binding sites encoded a larger number of Gln. polyGln in Rattus norvegicus and Peromyscus maniculatus consist of 38 and 37 Gln, respectively. All miRNA binding polysites were flanked by conserved nucleotide sequences, which were reflected in the conservatism of the flanking oligopeptides of polyGlu, polyAla, polyPro, polyGly, polyGln. TNR regions can simultaneously bind several miRNAs, which increases the dependence of gene expression on miRNA. The 2D structure of the binding sites' polynucleotides in mRNA promotes miRNA binding due to weak intramolecular interactions of the nucleotides of this mRNA region. The imposition of binding sites of different miRNA in the mRNA of ZFHX3 gene is a compact target for several miRNAs that compete with each other for the binding site.

### References:

1. Londin E., et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific miRNAs//Proc.Nat.Acad.Sc.USA. 2015. Vol.112. N10. P.1106-1115.

УДК 577.21

## СВОЙСТВА САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ miR-1322-3p В mRNA ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ОРТОЛОГОВ

 Юрикова О.Ю.<sup>1</sup>, Атамбаева Ш.А.<sup>1</sup>, Большой А.<sup>2</sup>, Иващенко А.Т.<sup>1</sup>
<sup>1</sup> Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан  
 050040, Алматы, пр.аль-Фараби 71, корп.6

<sup>2</sup> Department of Evolutionary and Environmental Biology, University of Haifa, Haifa, Israel  
 31905, Haifa, University of Haifa  
 e-mail: oksanayurikova@mail.ru

В CDS mRNA ATN1, BCL6B, HTT, MAGI1, MLLT3, MN1, THAP11, TBP генов человека и их ортологов выявлены полисайты связывания miR-1322-3p, которые кодируют полиаминокислоты. miR-1322-3p может регулировать экспрессию исследованных генов и участвовать в развитии заболеваний.

**Ключевые слова:** miR-1322-3p, mRNA, ортологичные гены, тринуклеотидные повторы

При выборе экспериментальных животных для изучения участия miRNA в регуляции экспрессии кандидатных генов различных заболеваний необходимо учитывать характеристики взаимодействия соответствующих miRNA с mRNA генов-мишеней. Установлено существование сайтов связывания miRNA в 5'-UTR, CDS и 3'-UTR областях mRNA. Одним из способов определения достоверности сайтов для miRNA является доказательство их существования в mRNA ортологичных генов. С помощью программы MirTarget была выявлена miR-1322-3p, имеющая сайты связывания в mRNA десятков генов человека [1]. Гены ATN1, BCL6B, HTT, MAGI1, MLLT3, MN1, THAP11, TBP участвуют в развитии нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Выявленные полисайты и характеристики взаимодействия mRNA с miR-1322-3p приведены в таблице. Свободная энергия взаимодействия ( $\Delta G$ ) miR-1322-3p с mRNA генов ATN1, BCL6B, HTT, MAGI1, MLLT3, MN1, THAP11, TBP изменялась в пределах  $-83 \div -93$  kJ/mole, а величина  $\Delta G/\Delta G_m$ , где  $\Delta G_m$  равно свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью варьировала от 83 до 92%. С увеличением длины полисайтов возрастает вероятность их взаимодействия с miRNA.

Ген (число сайтов связывания)	Положение сайта связывания, нт	Свободная энергия взаимодействия, $\Delta G$ , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$ , %
Hsa- ATN1 (15)	1687 ÷ 1732	-84 ÷ -93	83 ÷ 92
Hsa- BCL6B (6)	764 ÷ 779	-87 ÷ -89	85 ÷ 87,5
Hsa- HTT (18)	197 ÷ 248	-89 ÷ -91	87,5 ÷ 90
Hsa- MAGI1 (15)	1730 ÷ 1772	-85 ÷ -89	83 ÷ 87,5
Hsa-MLLT3 (34)	731 ÷ 836	-83 ÷ -89	81 ÷ 87,5
Hsa-MN1 (23)	2519 ÷ 2591	-85 ÷ -89	83 ÷ 87,5
Hsa-THAP11 (27)	548 ÷ 630	-85 ÷ -93	83 ÷ 92
Hsa-TBP (29)	451 ÷ 547	-85 ÷ -89	83 ÷ 87,5

Полисайты для связывания miR-1322-3p обнаруживаются в mRNA ортологичных генов многих видов животных. Сайты связывания miR-1322-3p в mRNA генов ATN1, HTT, MAGI1, MN1, THAP11, TBP кодируют полиглутамин, а генов BCL6B, MLLT3 – полисерин. Это связано с тем, что одинаковые нуклеотидные последовательности сайтов связывания в mRNA могут транслироваться в разных рамках считывания с синтезом разных полиаминокислот. Число полиаминокислот изменяется в процессе эволюции видов. Олигопептиды, фланкирующие полиаминокислоты, кодируемые сайтами связывания miR-1322-3p являются высоко консервативными. Помимо общего вклада в изучение механизмов патогенеза, вызванного участием ATN1, BCL6B, HTT, MAGI1, MLLT3, MN1, THAP11, TBP генов, проведенный нами анализ позволяет предложить адекватную экспериментальную модель животного для дальнейшего изучения регуляции экспрессии описанных генов посредством miR-1322-3p.

Увеличение числа сайтов связывания для miR-1322-3p в mRNA генов ATN1 и HTT может приводить к развитию нейродегенеративных патологий. У здорового человека число CAG повторов до 35, в мутантном

гене ATN1 - 48 – 93 повторов, в мутантном гене HTT - 39-75 повторов [2,3]. Вероятно, тринуклеотидные повторы в mRNA могут участвовать в развитии заболеваний как мишени miR-1322-3p.

Литература:

1. Niyazova R., Berillo O., Atambayeva Sh., Pyrkova A., Alybayeva A., Ivashchenko A. miR-1322 Binding sites in paralogous and orthologous genes// *Biomed Res Int.* 2015. Vol 2015. ID 962637. 7 pages.
2. Sh.I. Ahmad. *Neurodegenerative diseases.* Springer Science & Business Media. 2012. 390 p
3. Bobori C. *Molecular Genetics of Huntington's Disease// GeNeDis* 2014. 2015. Vol 822. P. 59-65

UDC 577.21

## PROPERTIES OF MIR-1322-3P BINDING SITES IN MRNA OF HUMAN TARGET GENES AND THEIR ORTHOLOGS

Yurikova O.Yu. <sup>1</sup>, Atambayeva Sh.A. <sup>1</sup>, Bolshoy A. <sup>2</sup>, Ivashchenko A.T. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan  
050038, al-Farabi 71, Almaty, Kazakhstan.

<sup>2</sup> Department of Evolutionary and Environmental Biology, University of Haifa, Haifa, Israel  
31905, Haifa, University of Haifa  
e-mail: oksanayurikova@mail.ru

In CDS region of mRNAs of ATN1, BCL6B, HTT, MAGI1, MLLT3, MN1, THAP11, TBP human genes and their orthologs, the miR-1322-3p binding polysites that encode polyamino acids were identified. miR-1322-3p can possibly regulate the expression of the described genes and participate in the development of diseases.

**Key words:** miR-1322-3p, mRNA, CDS, orthologous genes, trinucleotide repeats

For adequate choice of experimental animal model to study the miRNAs involvement in regulation of expression of candidate genes for various diseases, it is necessary to take into account the interaction characteristics of the corresponding miRNAs with mRNAs of target genes. miRNA binding sites are located in the 5'UTR, CDS, and 3'UTR regions of mRNAs animal genes. One of the ways to determine reliability of miRNA binding sites is to check the existence of these sites in mRNA of orthologous genes. Using the MirTarget program, miR-1322-3p which has binding sites in mRNAs of dozens of human genes was detected [1]. ATN1, BCL6B, HTT, MAGI1, MLLT3, MN1, THAP11, TBP human genes are involved in the development of neurodegenerative and oncological diseases. The polysites and the interaction characteristics of mRNA with miR-1322-3p are shown in the table. The free energy of hybridization ( $\Delta G$ ) of miR-1322-3p with mRNAs of ATN1, BCL6B, HTT, MAGI1, MLLT3, MN1, THAP11, TBP genes varied within  $-83 \div -93$  kJ/mole. With the increase in the length of polysites, the probability of their interaction with miRNAs increases.  $\Delta G/\Delta G_m$ , where  $\Delta G_m$  is equal to the free binding energy of miRNA with a fully complementary nucleotide sequence ranged from 83 to 92%. With the increase in the length of polysites, the probability of their interaction with miRNA increases.

Gene (number of binding sites)	Position of binding site, nt	Free energy of hybridization, $\Delta G$ , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$ , %
Hsa- ATN1 (15)	1687 ÷ 1732	-84 ÷ -93	83 ÷ 92
Hsa- BCL6B (6)	764 ÷ 779	-87 ÷ -89	85 ÷ 87,5
Hsa- HTT (18)	197 ÷ 248	-89 ÷ -91	87,5 ÷ 90
Hsa- MAGI1 (15)	1730 ÷ 1772	-85 ÷ -89	83 ÷ 87,5
Hsa-MLLT3 (34)	731 ÷ 836	-83 ÷ -89	81 ÷ 87,5
Hsa-MN1 (23)	2519 ÷ 2591	-85 ÷ -89	83 ÷ 87,5
Hsa-THAP11 (27)	548 ÷ 630	-85 ÷ -93	83 ÷ 92
Hsa-TBP (29)	451 ÷ 547	-85 ÷ -89	83 ÷ 87,5

MiR-1322-3p binding polysites are found in mRNAs of orthologous genes of many animal species. The miR-1322-3p binding sites in the mRNAs of ATN1, HTT, MAGI1, MN1, THAP11, TBP genes encode polyglutamine, and in genes BCL6B, MLLT3 - polyserin. This is due to the fact that the same nucleotide sequences of binding sites in

mRNA can be translated in different reading frames with the synthesis of different polyamino acids. The number of polyamino acids changes during the evolution of species. The oligopeptides flanking polyamino acids encoded by the miR-1322-3p binding sites are highly conserved. In addition to the general contribution to the study of mechanisms of pathogenesis caused by the participation of ATN1, BCL6B, HTT, MAGI1, MLLT3, MN1, THAP11, and TBP genes, the analysis allows to propose an adequate experimental animal model for further study of regulation of described genes expression by miR-1322-3p.

An increase in the number of miR-1322-3p binding sites in mRNAs of ATN1 and HTT genes can possibly lead to development of neurodegenerative pathologies. In a healthy person, the number of CAG repeats is up to 35, in the mutant ATN1 gene from 48 to 93 repeats is detected, in the mutant HTT gene the number of CAG repeats is about 39-75 [2,3]. It can be assumed that the trinucleotide repeats in mRNAs can participate in the development of diseases as targets of miR-1322-3p.

*References:*

1. Niyazova R., Berillo O., Atambayeva Sh., Pyrkova A., Alybayeva A., Ivashchenko A. miR-1322 Binding sites in paralogous and orthologous genes// *Biomed Res Int*. 2015. Vol 2015. ID 962637. 7 pages.
- 2 Sh.I. Ahmad. *Neurodegenerative Diseases*. Springer Science & Business Media. 2012. 390 p
- 3 Bobori C. *Molecular Genetics of Huntington's Disease*// *GeNeDis* 2014. 2015. Vol 822. P. 59-65

УДК: 004.81+004.93, ББК: 32.813.5+32.965.07

## СИСТЕМА МОНИТОРИНГА КОГНИТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ЭМОЦИОНАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА

**К.В.Сидоров, Н.Н.Филатова, П.Д.Шемаев**

*Тверской государственный технический университет, Россия, 170026, Тверь, Наб. Афанасия*

Рассмотрена биотехническая система «EEG/TK», предназначенная для мониторинга когнитивной активности и эмоциональных реакций у пользователей автоматизированных систем. Приведены особенности информационного, математического и методического обеспечений системы.

**Ключевые слова:** Когнитивная активность, инсайтные задачи, эмоции, эмоциональные реакции, ЭЭГ, речевые сигналы, аттрактор, биотехническая система.

Проблема совместного мониторинга эмоциональных реакций и когнитивной активности пользователей автоматизированных систем является актуальной в связи с повышением интенсивности интеллектуальной нагрузки в отдельных прикладных областях (например, медицинская диагностика, экспертные системы, дистанционное обучение, проектирование). Технические решения, основанные на интеграции разных видов мониторинга состояний пользователей, позволят перейти к задачам управления когнитивной активностью с учетом эмоционального контента поступающей информации.

Рассмотрена биотехническая система «EEG/TK», которая позволяет проводить мониторинг эмоциональных реакций человека на основе анализа его речи [1], а также регистрировать и анализировать изменения в электрической активности мозга при выполнении когнитивных операций. Для реализации указанной системы применен вариант технического и программного обеспечений биотехнической системы «EEG/Speech» [2], апробированный нами ранее в ходе экспериментов по мониторингу эмоциональных реакций. В рамках экспериментов с системой «EEG/TK» регистрировались ЭЭГ-сигналы испытуемых в процессе решения вычислительных, логических и инсайтных задач. Для анализа выделялись фрагменты ЭЭГ, каждый из которых связан с решением одной задачи.

В ходе экспериментов эпизодически использовалась эмоциогенная стимуляция испытуемых (аудиовизуальные, соматосенсорные и/или обонятельные стимулы) и регистрировались паттерны контрольной фразы. Для обработки и анализа ЭЭГ и речевых сигналов применяются математические аппараты нечеткой логики и нелинейной динамики.

Для оценки изменений характеристик зарегистрированных сигналов (по 19-ти отведениям ЭЭГ и образцам речи) осуществляется реконструкция аттракторов, восстановленных по соответствующим временным рядам. По каждому фрагменту ЭЭГ создается не менее 2-х аттракторов, что позволяет выявить изменения в их характеристиках при переходе от фазы восприятия информации к фазе ее осмысления (инсайта) [3].

Сценарий экспериментов предусматривает прерывание потока когнитивных заданий внешними эмоциогенными стимулами. Эффективность эмоциогенной стимуляции оценивается с помощью анализа не-

скольких аттракторов, реконструированных по последовательности речевых паттернов. Такая стратегия позволяет оценить направление развития эмоциональных реакций испытуемых.

Биотехническая система «EEG/TK» расширяет методики исследования когнитивной активности человека в условиях эмоциогенной стимуляции. Полученные результаты будут полезны для создания средств адаптации автоматизированных систем к индивидуальным возможностям пользователей.

*Литература:*

1. Filatova N.N., Sidorov K.V., Iliasov L.V. Automated system for analyzing and interpreting nonverbal information. *International Journal of Applied Engineering Research*. 2015, vol. 10, no. 24, pp. 45741–45749. 2. Filatova N.N., Sidorov K.V., Terekhin S.A., Vinogradov G.P. The system for the study of the dynamics of human emotional response using fuzzy trends. *Proc. 1st Int. Sci. Conf. "Intelligent Information Technologies for Industry" (IITI'16). Advances in Intelligent Systems and Computing* 451. A. Abraham et al. (Eds.). Springer Int. Publ., 2016, vol. 2, part III, pp. 175–184. DOI: [doi.org/10.1007/978-3-319-33816-3\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33816-3_18). 3. Filatova N.N., Sidorov K.V., Shemaev P.D. Prediction properties of attractors based on their fuzzy trend. *Proc. 2nd Int. Sci. Conf. "Intelligent Information Technologies for Industry" (IITI'17). Advances in Intelligent Systems and Computing* 679. A. Abraham et al. (Eds.). Springer Int. Publ., 2018, vol. 1, pp. 244–253. DOI: [doi.org/10.1007/978-3-319-68321-8\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68321-8_25).

**Финансирование:** Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-01-00742.

UDC 004.81+004.93, BBC 32.813.5+32.965.07

## A SYSTEM FOR MONITORING HUMAN COGNITIVE ACTIVITY AND EMOTIONAL REACTIONS

K.Sidorov, N.Filatova, P.Shemaev

Tver State Technical University, Russia, 170026, Tver, Afanasy Nikitin Emb., 22

The paper considers a bioengineering system "EEG/TK" designed for monitoring cognitive activity and emotional reactions of users of automated systems. It also describes features of information, mathematical and methodical support of the system.

**Key words:** Cognitive activity, insight problems, emotions, emotional responses, EEG, speech signals, attractor, bioengineering system.

The problem of joint monitoring of emotional reactions and cognitive activity of automated system users is relevant as the intellectual load intensity in certain applied areas (for example, medical diagnostics, expert systems, distance learning, design) increases. Technical solutions based on the integration of different types of user state monitoring will allow proceeding to cognitive activity management tasks taking into account emotional content of incoming information.

The paper considers a bioengineering system "EEG/TK", which allows monitoring human emotional reactions based on analyzing his speech [1], as well as registering and analyzing changes in brain electrical activity when performing cognitive operations. In order to implement this system, the authors apply a hardware and software version of the bioengineering system "EEG/Speech" [2], which was tested earlier during experiments on monitoring emotional reactions. The experiments with the "EEG/TK" system involved recording testees' EEG signals while they solved calculating, logical and insight problems. The analysis included emphasizing EEG fragments, each of which was connected with solving one problem.

The experiments occasionally used emotiogenic stimulation of testees (audiovisual, somatosensory and/or olfactory incentives) and recorded control phrase patterns. In order to process and analyze EEG and speech signals, the authors applied fuzzy logic and non-linear dynamics.

Evaluation of the changes in the characteristics of recorded signals (on 19 EEG leads and speech samples) was based on the reconstruction of attractors according to the relevant time series. Each EEG fragment corresponds to at least two created attractors, which makes it possible to detect changes in their characteristics during the transition from the phase of information perception to the phase of its comprehension (insight) [3].

The scenario of experiments involves interrupting the flow of cognitive tasks by external emotiogenic stimuli. The effectiveness of emotiogenic stimulation is evaluated using the analysis of several attractors reconstructed according to the sequence of speech patterns. Such strategy makes it possible to evaluate the direction of development of testees' emotional reactions.

The bioengineering system “EEG/TK” extends the methods of studying human cognitive activity in the conditions of emotiogenic stimulation. The obtained results will be useful for creating adaptation means of automated systems to users’ individual capabilities.

*References:*

1. Filatova N.N., Sidorov K.V., Iliasov L.V. Automated system for analyzing and interpreting nonverbal information. *International Journal of Applied Engineering Research*. 2015, vol. 10, no. 24, pp. 45741–45749.
2. Filatova N.N., Sidorov K.V., Terekhin S.A., Vinogradov G.P. The system for the study of the dynamics of human emotional response using fuzzy trends. *Proc. 1st Int. Sci. Conf. “Intelligent Information Technologies for Industry” (IITI’16). Advances in Intelligent Systems and Computing* 451. A. Abraham et al. (Eds.). Springer Int. Publ., 2016, vol. 2, part III, pp. 175–184. DOI: [doi.org/10.1007/978-3-319-33816-3\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33816-3_18).
3. Filatova N.N., Sidorov K.V., Shemaev P.D. Prediction properties of attractors based on their fuzzy trend. *Proc. 2nd Int. Sci. Conf. “Intelligent Information Technologies for Industry” (IITI’17). Advances in Intelligent Systems and Computing* 679. A. Abraham et al. (Eds.). Springer Int. Publ., 2018, vol. 1, pp. 244–253. DOI: [doi.org/10.1007/978-3-319-68321-8\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68321-8_25).

**Grant:** The reported study was funded by RFBR according to the research project № 17-01-00742.

# БИОЭКОНОМИКА

# BIOECONOMICS

## БИОСЕНСОРИКА: СОВРЕМЕННЫЕ ВЫЗОВЫ И РЕШЕНИЯ

## BIOSENSORICS: CHALLENGES AND SOLUTIONS

1. АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗАТОР ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА, Алферов В.А., Арляпов В.А. ....	543
AMPEROMETRIC BIOSENSOR ANALYZER FOR EXPRESS DETERMINATION OF BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND, Alferov V.A., Arlyapov V.A. ....	544
2. АПТАСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОПОЛИМЕРИЗОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ И СУПРАМОЛЕУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ И БЕЛКОВ, Евтюгин Г.А., Порфирьева А.В. ....	545
APTASENSORS BASED ON ELECTROPOLYMERIZED MATERIALS AND SUPRAMOLECULAR STRUCTURES FOR THE DETERMINATION OF MYCOTOXINS AND PROTEINS, Evtugyn G.A., Porfireva A.V. ....	545
3. БЫСТРЫЙ МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ МАГНИТНЫХ НАНОМЕТОК В 3D СТРУКТУРАХ, Никитин П.И., Орлов А.В., Никитин М.П., Брагина В.А., Знойко С.Л., Горшков Б.Г. ....	546
RAPID MULTIPLEX QUANTITATIVE ANALYSIS OF COMPLEX MEDIUMS BASED ON HIGHLY SENSITIVE REGISTRATION OF MAGNETIC NANOLABELS IN 3D STRUCTURES, Nikitin P.I.f, Orlov A.V., Nikitin M.P., Bragina V.A., Znoyko S.L., Gorshkov B.G. ....	547
4. ГОМОГЕННЫЙ АНАЛИЗ МИКРОРНК-141 НА ОСНОВЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ПЕРОКСИДАЗА-ПОДОБНОГО ДНКЗИМА, О.Л.Бодулёв, И.Ю.Сахаров ....	548
HOMOGENEOUS ASSAY OF MICRORNA-141 BASED ON THE USE OF ALLOSTERIC ACTIVATION OF PEROXIDASE-MIMICKING DNAZYME, O.Bodulev, I. Sakharov ....	548
5. ДЕТЕКЦИЯ микроРНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ НАНОПРОВОЛОЧНОГО БИОСЕНСОРА, Мальсагова К.А., Плешакова Т.О., Иванов Ю.Д., Попов В.П., Кушлинский Н.Е., Арчаков А.И. ....	549
DETECTION OF miRNA, ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF BREAST CANCER, IN PLASMA WITH A NANOWIRE BIOSENSOR, Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Ivanov Yu.D., Popov V.P., Kushlinskii N.E., Archakov A.I. ....	550
6. ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В КАЧЕСТВЕ БИОМЕТОК, Горячева И.Ю. ....	551
LUMINESCENT NANOPARTICLES AS BIOMARKERS, Goryacheva I.Yu. ....	551
7. МИКРОФЛЮИДНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА, Губайдуллина М.К., Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. ....	552
MICROFLUID SOLUTIONS FOR INCREASING THE SENSITIVITY OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS, Gubaidullina M.K., Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	553
8. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМПРИНТИНГ: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ СПОСОБ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ МОЛЕКУЛЯРНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ, Н. Тарранум ....	554
MOLECULAR IMPRINTING: A POTENTIAL TECHNIQUE TO MEET THE CHALLENGES IN MOLECULAR RECOGNITION, Nazia Tarannum ....	555
9. НОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ БИОСЕНСОРОМ, БИОТЕХНОЛОГИЕЙ И НАНОТЕХНОЛОГИЕЙ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ, М.С. Гаур ....	555
AN EMERGING INTERFACE BETWEEN BIOSENSOR, BIOTECHNOLOGY AND NANOTECHNOLOGY: PRESENT STATUS AND PROSPECTS, M.S. Gaur ....	556



10. НОВЫЕ ПЛАЗМОННЫЕ МЕТКИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ ДЛЯ ИММУНОАНАЛИЗА, Хлебцов Н. Г., Хлебцов Б. Н., Пылаев Т. Е., Ханадеев В. А., Браташов Д. Н. ....	557
NEW PLASMONIC SERS TAGS FOR IMMUNOASSAY, Khlebtsov N. G., Khlebtsov B. N., Pylaev T. E., Khanadeev V. A., Bratashov D. N. ....	558
11. ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ БИОЧИПЫ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА В КАЧЕСТВЕ МЕТКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ, Рубцова М.Ю., Преснова Г.В., Филиппова А.А., Уляшова М.М., Егоров А.М. ....	559
OLIGONUCLEOTIDE BIOCHIPS WITH GOLD NANOPARTICLES AS A LABEL FOR IDENTIFICATION OF GENETIC DETERMINANTS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE, Rubtsova M.Yu., Presnova G.V., Filippova A.A., Ulyashova M.M., Egorov A.M. ....	560
12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПСИНА С ПОМОЩЬЮ ПЬЕЗОКВАРЦЕВОГО СЕНСОРА НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО- ИМПРИНТИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ, Н.А. Карасеваа, Т.Н. Ермолаеваа, Б. Мизайкоффб ....	561
DETECTION OF TRYPSIN VIA PIEZOELECTRIC SENSOR ON THE BASIS OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS, Nadezhda A. Karasevaa, Tatyana N. Ermolaevaa, Boris Mizaikoffb ....	562
13. ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОСТРУКТУРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ, Партима Р. Соланки ....	563
PROSPECTS OF NANOSTRUCTURED MATERIALS FOR CLINICAL DANOSTICS, Partima R Solanki ....	564
14. ПЛАНШЕТНЫЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА, СКОНСТРУИРОВАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, Бодулев О.Л., Грибас А.В., Колосова А.Ю., Сахаров И.Ю. ....	565
MICROPLATE CHEMILUMINESCENT ASSAYS BASED ON OLIGONUCLEOTIDE USE, Bodulev O. L., Gribas A.V., Kolosova A.Yu., Sakharov I.Yu. ....	565
15. ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИММУНОХРОМАТО-ГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ, Соболев А. М., Цюпка Д.В., Белоглазова Н.В, Горячева И. Ю. ....	566
APPLICATION OF FLUORESCENT NANOPARTICLES FOR THE DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS, Sobolev A.M., Tsyupka D.V., Beloglazova N.V., Goryacheva I.Yu. ....	566
16. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ НАНОБИОСЕНСОРА ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ, СВЯЗАННОГО С ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, – ОТ БИОЛОГИИ К КЛИНИКЕ, П.К. Мишра ....	567
DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NANOBIOSENSOR FOR EARLY DIAGNOSIS OF ENVIRONMENTAL ASSOCIATED GYNAECOLOGICAL CANCERS – FROM BIOLOGY TO CLINICAL TRANSLATION, P.K.Mishra ....	568
17. РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУНОАНАЛИЗА МИКОТОКСИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ПЛАНАРНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ ИЗОБРАЖЕНИЙ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ЯЧМЕНЯ И 1000 ПРОБ ПИВА, Питерс Дж., Хааснут В., Нилен М.В.Ф. ....	568
DEVELOPMENT OF MULTIPLEX MYCOTOXIN IMMUNOASSAY USING FLOW CYTOMETRY AND IMAGING PLANAR ARRAY ANALYSERS AND ITS APPLICATION TO BARLEY AND 1000 BEER SAMPLES, Peters J., Haasnoot W., Nielen M.W.F. ....	570
18. РАЗРАБОТКА СТРАТЕГИИ УСИЛЕНИЯ СИГНАЛА ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТЕТРАЦИКЛИНОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ, Фарафонова О.В., Ермолаева Т.Н. ....	571
STRATEGY DEVELOPMENT OF PIEZOELECTRIC IMMUNOSENSOR SIGNAL AMPLIFICATION TO DETERMINE RESIDUAL TETRACYCLINE CONCENTRATIONS IN FOOD PRODUCTS, Farafonova O.V., Ermolaeva T.N. ....	572
19. РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССНОГО ТЕСТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МАРКЕРА С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА У СОБАК, Бызова Н. А., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. ....	572
DEVELOPMENT OF RAPID TEST FOR THE DETECTION OF INFLAMMATORY MARKER OF C-REACTIVE PROTEIN IN DOGS, Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	573
20. СОЗДАНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСКОЛЬКИХ АНТИБИОТИКОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ, Еремин С.А., Шанин И.А., Кострикина Е.С., Лебедин Ю.С. ....	574
DEVELOPMENT OF IMMUNOCHEMICAL TEST-SYSTEMS FOR PARALLEL DETERMINATION OF MULTIPLE ANTIBIOTICS IN FOODSTUFFS, Eremin S.A., Shanin I.A., Kostrikina E.S., Lebedin Yu.S. ....	574
21. ТЕХНОЛОГИЯ СИНТЕЗА УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ДНК-АПТАМЕРОВ, Храмов П.В., Кропанева М.Д., Калашникова Т.В., Раев М.Б. ....	575

METHOD OF SYNTHESIS OF CARBON NANOPARTICLES–APTAMER CONJUGATES, Khrantsov P.V., Kropaneva M.D., Kalashnikova T.V., Rayev M.B. ....	576
22. ЭКСПРЕССНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ В МЕМБРАННЫХ МИКРОФЛЮИДНЫХ СИСТЕМАХ, Дзантиев Б.Б. ....	577
RAPID IMMUNOASSAYS IN MEMBRANE MICROFLUIDIC SYSTEMS, Dzantiev B.B. ....	578
23. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, Порфирьева А.В., Куликова Т.Н., Степанова В.Б. ....	576
ELECTROCHEMICAL DNA SENSORS FOR THE DETERMINATION OF ANTHRACYCLINE ANTITUMOR MEDICATIONS, Porfireva A.V., Kulikova T.N., Stepanova V.B. ....	579
24. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИООБРАЗЦОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ КЛАСТЕРИЗАЦИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА, Шумянцева В.В., Булко Т.В., Сиголаева Л.В., Кузиков А.В., Погодин П. В., Арчаков А.И. ....	579
THE MULTI-PARAMETER ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF BIOSAMPLES COMBINED WITH COMPUTATIONAL CLUSTER ASSAY, Shumyantseva V.V., Bulko T. V., Sigolaeva L.V., Kuzikov A. V., Pogodin P. V., Archakov A. I. ....	580

УДК 602.4:628.35:664

## АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗАТОР ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА

Алферов В.А., Арляпов В.А.

Тульский государственный университет, Тула, Россия  
300012, Тула, пр. Ленина, 92  
E-mail: chem@tsu.tula.ru

Разработан биосенсорный анализатор для экспресс-определения биохимического потребления кислорода на основе амперометрического кислородного электрода с использованием в качестве биосенсорного элемента дрожжей *D. hansenii*, иммобилизованных в ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном.

**Ключевые слова:** биосенсор, дрожжи *Debaryomyces hansenii*, биохимическое потребление кислорода, поливиниловый спирт.

Биохимическое (или биологическое) потребление кислорода (БПК) является одним из наиболее широко используемых показателей для контроля чистоты водных сред, и представляет, по определению, количество кислорода, необходимое для биохимического окисления органических веществ, содержащихся в образце. Существующий метод определения БПК основан на тестах, продолжительность которых составляет 5, 10 или 20 суток (ПНДФ 14. 1:2:3:4. 123-97). В силу значительной продолжительности процедуры метод не является адекватным в современных условиях жизни, поскольку представляет результаты анализа со значительной задержкой (минимум 5 суток от момента поступления пробы). В настоящее время все промышленные предприятия и водоочистные сооружения РФ используют для повседневного рутинного анализа сточных вод упомянутый метод БПК<sub>5</sub>.

В рамках проведенных исследований разработан биосенсорный анализатор для экспресс-определения биохимического потребления кислорода на основе амперометрического кислородного электрода с использованием в качестве биосенсорного элемента дрожжей *D. hansenii*, иммобилизованных в ПВС, модифицированный N-винилпирролидоном. Показано, что используемые дрожжи *D. hansenii* обладают широкой субстратной специфичностью – способны окислять субстраты, относящиеся к разным классам органических соединений. Диапазон определяемых концентраций БПК<sub>5</sub> разработанным биосенсором составил 0,16-30 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup> без учета разбавления пробы.

Проведена апробация разработанного анализатора на образцах проб различного состава и происхождения. Показано, что использование дрожжевых клеток *D. hansenii*, иммобилизованных в ПВС модифицированный N-винилпирролидоном в сочетании с разработанным амперометрическим датчиком и измерительным преобразователем позволяет получать данные, имеющие высокую корреляцию с данными стандартного метода. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования разработанного биосенсорного анализатора как прототипа опытных образцов приборов для серийного применения.

Принципиальным отличием метода анализа с использованием разрабатываемого прибора от существующего является сокращение времени анализа от 5 суток до 5 - 15 мин. С помощью данного анализатора возможно осуществлять анализ в режиме реального времени, для измерения не требуется привлечения высокоспециализированного персонала. Прибор может использоваться как в стационарных условиях, так и в составе подвижных лабораторий. Разработанные в ходе выполнения проекта анализаторы нового поколения могут использоваться для выполнения ежедневных текущих анализов проб воды на предприятиях системы водоочистки РФ, станциями санитарно-эпидемиологического контроля, службами МЧС, МинПрироды, экологическими структурами и биотехнологическими предприятиями.

Широкомасштабное использование разрабатываемого анализатора приведет к существенному сокращению времени химического анализа сточных, природных и поверхностных вод, что в свою очередь повысит экономическую эффективность служб и организаций занимающихся контролем состояния водных ресурсов. Использование современного физико-химического метода анализа вместо морально устаревшего классического химического метода анализа БПК позволит повысить уровень автоматизации анализа, в том числе путем встраивания разрабатываемых анализаторов в состав технологического оборудования для контроля качества сточных вод очистных сооружений на предприятиях. Последнее, в свою очередь, избавит от необходимости постоянного отбора проб и даст возможность проводить «он-лайн» мониторинг.

УДК 602.4:628.35:664

## AMPEROMETRIC BIOSENSOR ANALYZER FOR EXPRESS DETERMINATION OF BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND

Alferov V.A., Arlyapov V.A.

Tula State University, Tula, Russia  
 300012, Tula Lenin Avenue, 92  
 E-mail: chem@tsu.tula.ru

A biosensor analyzer was developed for the rapid determination of biochemical oxygen demand based on an amperometric oxygen electrode using yeast *D. hansenii* immobilized in PVA modified with N-vinylpyrrolidone as a biosensor element.

**Key words:** biosensor, yeast *Debaryomyces hansenii*, biochemical oxygen consumption, polyvinyl alcohol.

A most important integral characteristic of water quality is the biochemical oxygen demand (BOD), that is, the amount of dissolved oxygen (mg) necessary for oxidation of all biodegradable organic compounds present in 1 dm<sup>3</sup> of water. The existing method of «biological oxygen demand» determination is based on the tests which takes 5, 10 or 20 days (PNDF 14. 1:2:3:4. 123-97). Owing to considerable duration of procedure the method is not adequate up to date as represents results of the analysis with a considerable delay (a minimum of 5 days from the moment of receipt of test). Now all treatment facilities of the Russian Federation use the mentioned method «BOD5» for the daily routine analysis of sewage.

Within the framework of the research, a biosensor analyzer was developed for the rapid determination of biochemical oxygen demand based on an amperometric oxygen electrode using as a biosensor element yeast *D. hansenii* immobilized in PVA modified with N-vinylpyrrolidone. It was shown that the used yeast *D. hansenii* possess broad substrate specificity - they are capable of oxidizing substrates that belong to different classes of organic compounds. The range of detectable concentrations of BOD<sub>5</sub> by the developed biosensor was 0,16-30 mg O<sub>2</sub> / dm<sup>3</sup> without taking into account the dilution of the sample.

Approbation of the developed analyzer on samples of different composition and origin was carried out. It is shown that the use of *D. hansenii* yeast cells immobilized in PVA modified with N-vinylpyrrolidone in combination with the developed amperometric sensor and the measuring transducer allows obtaining data having a high correlation with the data of the standard method. The obtained results testify to the possibility of using the developed biosensor analyzer as a prototype of devices for serial use.

A fundamental difference between the developed technique from the existing one is the reduction of the analysis time from 5 days to 5-15 minutes. So it is possible to perform real-time analysis, and it does not require the highly specialized personnel for the measurement. The device can be used both in stationary conditions and in mobile laboratories. Analyzers can be used for equipment of the industrial enterprises and systems of water purification of the Russian Federation, for use by Stations of the sanitary-and-epidemiologic control, services of the Ministry of Emergency Measures, Ministry of nature, ecological structures.

The large-scale use of the developed analyzer will lead to a significant reduction in the time of chemical analysis of

sewage, natural and surface waters, which in turn will increase the economic efficiency of services and organizations involved in the water resources monitoring. Using a modern physicochemical method of analysis instead of the outdated classical chemical method of BOD analysis will allow to increase the level of automation of analysis, including by integrating the analyzers being developed into the composition of technological equipment for monitoring the quality of sewage treatment plants at enterprises. The latter, in turn, will eliminate the need for constant sampling and will provide an opportunity to conduct "on-line" monitoring.

УДК 543.9+543.552

## АПТАСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОПОЛИМЕРИЗОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ И СУПРАМОЛЕУЛЯРНЫХ СТРУКТУР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ И БЕЛКОВ

Евтюгин Г.А., Порфирьева А.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18  
e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Разработаны новые электрохимические биосенсоры на основе аптамеров для вольтамперометрического и импедиметрического определения белков (тромбин, цитохром с) и микотоксинов (охратоксин А, афлатоксин В1 и афлатоксин М1).

**Ключевые слова:** аптамер, аптасенсор, ДНК-сенсор, определение микотоксинов

Электрохимические биосенсоры являются перспективными средствами экспресс-определения биологически активных соединений. В докладе рассмотрены принципы конструирования электрохимических биосенсоров, включающих аптамеры, для определения ряда белков (тромбин, цитохром с) и микотоксинов (охратоксин, афлатоксин В1 и афлатоксин М1), особенностью которых является использование в качестве генерирующего сигнала компонента электрохимически активных полимеров. Установлено влияние способа получения полимерного слоя и включения в него аптамера на аналитические характеристики определения аналитов с вольтамперометрической и импедиметрической регистрацией сигнала. Выявлено повышение чувствительности определения аналитов при использовании макроциклических носителей с редокс-активными терминальными группами. Представлены примеры анализа реальных объектов с помощью разработанных биосенсоров и обсуждается возможное влияние матрицы на результаты измерения. Разработанные биосенсоры позволяют достичь нано- и пикомолярных концентраций определяемых соединений.

Исследования проводили при поддержке РФФИ (грант 17-13-01208).

UDC 543.9+543.552

## APTASENSORS BASED ON ELECTROPOLYMERIZED MATERIALS AND SUPRAMOLECULAR STRUCTURES FOR THE DETERMINATION OF MYCOTOXINS AND PROTEINS

Evtugyn G.A., Porfireva A.V.

Kazan (Volga-Region) Federal University, Russia, 420008, Kazan, Kremlevskaya Street, 18  
e-mail: Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Electrochemical biosensors based on aptamers have been developed for the voltammetric and impedimetric determination of proteins (thrombin, cytochrome c) and mycotoxins (ochratoxin A, aflatoxin B1 and aflatoxin M1).

**Key words:** aptamer, aptasensor, DNA sensor, mycotoxin determination

Electrochemical biosensors are promising devices for the fast determination of biologically active compounds. In this report, principles of the assembling of electrochemical biosensors implementing aptamers are considered for determination of a number of proteins (thrombin, cytochrome c) and mycotoxins (ochratoxin A, aflatoxin B1 and aflatoxin M1). Such aptasensors utilize electrochemically active polymers as signal generating components. The influence of the assembling of the polymer layer and aptamer attachment on the analytical characteristics

of analyte determination was established for voltammetric and impedimetric signal measurement. It was found that sensitivity of the analyte determination could be improved by the use of macrocyclic carriers with terminal redox active functional groups. The approach was illustrated by the examples of real sample assays. Possible influence of matrix effects on the measurement results is discussed. The biosensors developed make it possible to determine nano- to picomolar concentrations of the compounds determined.

The investigation was supported by Russian Science Foundation (grant 17-13-01208).

УДК 537.624.9

## БЫСТРЫЙ МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ СЛОЖНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ МАГНИТНЫХ НАНОМЕТОК В 3D СТРУКТУРАХ

Никитин П.И.<sup>1</sup>, Орлов А.В.<sup>1,2</sup>, Никитин М.П.<sup>2</sup>, Брагина В.А.<sup>1</sup>, Знойко С.Л.<sup>1</sup>, Горшков Б.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, Москва, Россия  
 119991, г. Москва, ул Вавилова 38, E-mail: nikitin@kapella.gpi.ru

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт (государственный университет)

Разработаны высокочувствительные и экспрессные методы мультиплексного иммуноанализа с использованием магнитных наночастиц в качестве меток. Достигнутые параметры показывают перспективность методов для медицинской *in vitro* диагностики, контроля безопасности продуктов питания и т. д.

**Ключевые слова:** магнитные наночастицы, иммуноанализ, онкомаркеры, кардиомакеры, ботулинические нейротоксины, стафилококковые токсины.

Разработаны методы быстрого иммунохимического анализа на основе применения магнитных наночастиц (МЧ) в качестве меток. Для этого впервые предложены высокочувствительные методы детекции МЧ, основанные на нелинейном намагничивании частиц переменным магнитным полем на двух частотах и регистрации отклика на комбинаторных частотах [1, 2]. Созданы регистраторы, имеющие рекордные пределы обнаружения 0,4 нг МЧ в объеме 0,2 мл и чрезвычайно широкий линейный динамический диапазон 7 порядков [3]. Продемонстрировано, что регистраторы способны детектировать МЧ на основе изотопов <sup>59</sup>Fe с чувствительностью на уровне детекторов  $\gamma$ -излучения [4], что позволяет заменить радиоактивные метки в ряде биомедицинских направлений.

На основе созданных электронных регистраторов разработаны различные форматы магнитного иммуноанализа. В частности, за счет применения в качестве твердой фазы волоконных 3D структур с развитой иммуноактивной поверхностью и быстрой иммунофильтрацией антигенов удалось улучшить на 2-3 порядка пороги чувствительности и значительно сократить время анализа по сравнению с иммуноферментным анализом (ИФА) [5]. Пороги детекции ряда стафилококковых токсинов в цельном молоке составили 4-10 пг/мл, что в  $\approx$  50 раз лучше, чем у стандартных ИФА. При этом зависимость сигналов имеет линейный характер при изменении концентрации аналита на 3 порядка, что обеспечивает высокую точность измерений. На основе иммунохроматографических тест-полосок и "сухих" реагентов разработана биосенсорная платформа, сочетающая быстроту и простоту проведения анализа белковых маркеров заболеваний в плазме крови на уровне концентраций 25 пг/мл [3]. Разработаны мультиплексные способы анализа для одновременного измерения концентраций нескольких антигенов (токсинов, кардио- и онкомаркеров и т.д.) [6, 7], методы магнитной цитометрии, позволяющие быстро и количественно определять онкологический статус клеток, уровень экспрессии антигенов на поверхности клеток и т.д. [8].

### Литература:

1. Никитин П.И., Ветошко П.М. Измеритель магнитной восприимчивости. // Патент РФ № 2166751, 09.03.2000.
2. Никитин П.И., Ветошко П.М. Способ анализа смеси биологических и/или химических компонентов с использованием магнитных частиц и устройство для его осуществления. // Патент РФ № 2177611, 09.03. 2000.
3. Orlov A. V. et al. Rapid dry-reagent immunomagnetic biosensing platform based on volumetric detection of nanoparticles on 3D structures // *Biosens. Bioelectron.* 2016. Vol. 79, pp. 423–429.
4. Nikitin M.P., Torno M., Chen H., Rosengart A., Nikitin P.I. Quantitative real-time *in vivo* detection of magnetic nanoparticles by their non-linear magnetization // *J. Appl. Phys.* 2008. Vol. 103 (7), p. 07A304.
5. Orlov A. V. et al. Magnetic Immunoassay for Detection of Staphylococcal Toxins in Complex Media. // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85. pp. 1154-1163.

6. Orlov A.V. et al. Multiplex biosensing based on highly sensitive magnetic nanolabel quantification: rapid detection of botulinum neurotoxins A, B and E in liquids. // *Anal. Chem.* 2016, Vol. 88. pp. 10419-10426.

7. Nikitin M.P. et al. Multiplex biosensing with highly sensitive magnetic nanoparticle quantification method. // *J. Magn. Magn. Mat.* 2017 (в печати). Available on line by DOI: 10.1016/j.jmmm.2017.10.078.

8. Shipunova V.I. et al. // MPQ-Cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle-cell interactions. *Nanoscale.* 2016, Vol. 8, pp. 12764-12772.

UDC 537.624.9

## RAPID MULTIPLEX QUANTITATIVE ANALYSIS OF COMPLEX MEDIUMS BASED ON HIGHLY SENSITIVE REGISTRATION OF MAGNETIC NANOLABELS IN 3D STRUCTURES

Nikitin P.I.<sup>1</sup>, Orlov A.V.<sup>1,2</sup>, Nikitin M.P.<sup>2</sup>, Bragina V.A.<sup>1</sup>, Znoyko S.L.<sup>1</sup>, Gorshkov B.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

38 Vavilova St., Moscow 119991 Russia, E-mail: [nikitin@kapella.gpi.ru](mailto:nikitin@kapella.gpi.ru)

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (State University)

Highly-sensitive methods of multiplex and express immunoassays have been developed based on magnetic nanoparticles used as labels. The demonstrated parameters indicate that the methods are promising for medical in vitro diagnostics, food safety control, etc.

**Key words:** magnetic nanoparticles, immunoassay, cancer markers, cardiac markers, botulinum neurotoxins, staphylococcal toxins.

Rapid immunochemical assays have been developed based on magnetic nanoparticles (MP) employed as labels. For this purpose, highly-sensitive methods of MP detection have been proposed for the first time, in which the MP are non-linearly magnetized by a magnetic field generated at two frequencies, and their response is recorded at combinatorial frequencies [1, 2]. The readers that feature record limits of detection of 0.4 ng of MP in the volume of 0.2 ml and an extremely wide 7-order linear range [3]. The sensitivity levels of these compact readers for registration of MP based on <sup>59</sup>Fe radioisotopes has been demonstrated to be similar to that of  $\gamma$ -radiation detectors so that the radioactive labels may be replaced in some biomedical applications.

Based on these electronic readers different formats of magnetic immunoassay have been developed. In particular, employment of fiber 3D structures as the assay solid phases, which offer enhanced immunoactive surface areas and rapid immunofiltration of antigens, has improved the limits of detection by 2-3 orders and reduced the assay time as compared to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [5]. The achieved limits of detection in whole milk of different staphylococcal toxins are 4-10 pg/ml, which is about 50 times better than that by the standard ELISA. Remarkably, the signal dependence is linear within 3 orders of analyte concentration, and that provides high precision of measurements. Another biosensing platform has been developed based on immunochromatographic test strips and "dry" reagents. It provides rapid and simple analysis of protein markers of diseases on the level of 25 pg/ml [3]. The multiplex methods have been also proposed for measuring the concentrations of several antigens (toxins, cardio- and cancer markers, ect) simultaneously in complex mediums [6, 7]. Besides, the method of magnetic cytometry has been developed for rapid quantitative determination of the oncological status of cells, as well as for assessment of antigen expression on cell surface, etc. [8].

### References:

1. Nikitin P.I., Vetoshko P.M. Meter of magnetic susceptibility. // Patent of Russian Federation No. 2166751, 09 March 2000.
2. Nikitin P.I., Vetoshko P.M. Process of analysis of mixture of biologic and/or chemical components with use of magnetic particles and device for its implementation. // Patent of Russian Federation No. 2177611, 09 March 2000.
3. Orlov A.V. et al. Rapid dry-reagent immunomagnetic biosensing platform based on volumetric detection of nanoparticles on 3D structures // *Biosens. Bioelectron.* 2016. Vol. 79, pp. 423–429.
4. Nikitin M.P., Torno M., Chen H., Rosengart A., Nikitin P.I. Quantitative real-time in vivo detection of magnetic nanoparticles by their non-linear magnetization // *J. Appl. Phys.* 2008. Vol. 103 (7), p. 07A304.
5. Orlov A.V. et al. Magnetic Immunoassay for Detection of Staphylococcal Toxins in Complex Media. // *Anal. Chem.* 2013. Vol. 85. pp. 1154-1163.
6. Orlov A.V. et al. Multiplex biosensing based on highly sensitive magnetic nanolabel quantification: rapid detection of botulinum neurotoxins A, B and E in liquids. // *Anal. Chem.* 2016, Vol. 88. pp. 10419-10426.
7. Nikitin M.P. et al. Multiplex biosensing with highly sensitive magnetic nanoparticle quantification method. // *J.*

*Magn. Magn. Mat. 2017 (in press). Available on line by DOI: 10.1016/j.jmmm.2017.10.078.  
 8. Shipunova V.I. et al. // MPQ-Cytometry: a magnetism-based method for quantification of nanoparticle-cell interactions. Nanoscale. 2016, Vol. 8, pp. 12764-12772.*

УДК: 543.94, ББК: 24.46

## ГОМОГЕННЫЙ АНАЛИЗ МИКРОРНК-141 НА ОСНОВЕ АЛЛОСТЕРИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ ПЕРОКСИДАЗА-ПОДОБНОГО ДНКЗИМА

**О.Л.Бодулёв, И.Ю.Сахаров**

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 11, bodulevoleg@mail.ru, 89265549284*

В данной работе разработан гомогенный метод определения нуклеиновых кислот, основанный на аллостерической активации пероксидаза-подобного ДНКзима. Данный метод характеризуется высокой чувствительностью, низким пределом обнаружения, а также быстротой и легкостью исполнения. Данные преимущества позволили применить данный метод для определения маркера рака микроРНК-141.

**Ключевые слова:** нуклеиновые кислоты, микроРНК, хемилюминесценция, гомогенный анализ, пероксидаза-подобные ДНКзимы, аллостерическая активация

Разработан гомогенный хемилюминесцентный метод детекции микроРНК-141, основанный на аллостерической активации пероксидаза-подобного ДНКзима (ППДНКзима). Используемые в анализе зонды включают в себя фрагмент ППДНКзима и ковалентно связанный с ним олигонуклеотид, комплементарный микроРНК-141. Взаимодействие данного олигонуклеотида с фрагментом ППДНКзима изменяет структуру G-квадруплекса и, тем самым, уменьшает пероксидазную активность зонда. В присутствии микроРНК-141 данное взаимодействие разрушается, так как комплементарный к микроРНК-141 олигонуклеотид формирует с микроРНК-141 стабильный дуплекс, в результате чего в структуре G-квадруплекса происходят изменения, сопровождающиеся усилением каталитической активности ППДНКзима. Механизм РНК-зависимой активации ППДНКзим-содержащего зонда подтвержден моделированием зондов, а также моделированием их комплексов с микроРНК-141.

Разработан гомогенный хемилюминесцентный метод детекции микроРНК-141, основанный на аллостерической активации пероксидаза-подобного ДНКзима (ППДНКзима). Предел обнаружения и линейный диапазон данного метода составили 0,1 нМ и 0,5-100 нМ соответственно. Чувствительность анализа высокая (80 000 нМ<sup>-1</sup>). Величины коэффициента отклонения (CV), измеренные в пределах рабочего диапазона, меньше 2%, что говорит о высокой точности анализа.

**Финансирование:** Данная работа была поддержана Российским Научным Фондом (17-14-01042).

УДК: 543.94, ББК: 24.46

## HOMOGENEOUS ASSAY OF MICRORNA-141 BASED ON THE USE OF ALLOSTERIC ACTIVATION OF PEROXIDASE-MIMICKING DNAZYME

**O.Bodulev, I. Sakharov**

*Lomonosov Moscow State University, chemical faculty, Russia, 119991, Moscow, Leninsky Gory, 11*

The homogeneous assay of nucleic acids based on the use of allosteric activation of peroxidase-mimicking DNAzyme is developed. This assay is simple and fast, and characterized by high sensitivity and low detection limit. Those advantages allowed an application of this method for the detection of microRNA-141, one of the cancer markers.

**Key words:** nucleic acids, microRNA, chemiluminescence, homogeneous analysis, peroxidase-mimicking DNAzyme, allosteric activation

Homogeneous chemiluminescent method for microRNA-141 detection based on allosteric activation of peroxidase-mimicking DNAzyme (PMDNAzyme) was developed. The used probes contained PMDNAzyme

fragment and the oligonucleotide complementary to microRNA-141, which reacted each other resulting in changes in G-quadruplex structure of the PMDNAzyme and decreasing peroxidase-like activity of the probe. In the presence of the microRNA-141 such interactions were broken up because the complementary fragment of the probe formed stable duplex with microRNA-141. As a result, some reorganizations in G-quadruplex structure of the probe proceed, which are accompanied with enhancement of the catalytic activity of PMDNAzyme. The mechanism of RNA-dependent activation of PMDNAzyme-containing probes was confirmed by modeling of the probes and their complexes with microRNA-141.

Homogeneous chemiluminescent method for microRNA-141 detection based on allosteric activation of peroxidase-mimicking DNAzyme (PMDNAzyme) was developed. The detection limit value and the linear range were shown to be 0.1 nM and 0,5-100 nM, respectively. The sensitivity of the assay was high (80 000 nM<sup>-1</sup>). The values of coefficient of variation (CV) measured within the working range varied less than 2%, which says about a high precision of the proposed assay.

**Grant:** This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 17-14-01042).

УДК 621.039.75

## ДЕТЕКЦИЯ МИКРОРНК, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ПОМОЩЬЮ НАНОПРОВОЛОЧНОГО БИОСЕНСОРА

**Мальсагова К.А., Плешакова Т.О., Иванов Ю.Д., Попов В.П., Кушлинский Н.Е., Арчаков А.И.**

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

Показана возможность использования нанопроволочного биосенсора для детекции ДНК-олигонуклеотида и выделенной из плазмы крови микроРНК, ассоциированных с развитием рака молочной железы, в буферном растворе. Концентрационный предел обнаружения одНК с помощью нанопроволочного биосенсора составил 10-17М.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, миРНК, ДНК-олигонуклеотид, нанопроволока, нанопроволочный биосенсор.

Нанопроволочный биосенсор (НП-биосенсор) позволяет регистрировать белковые маркеры в буферных растворах при низких концентрациях (<10-15 М), а также в биообразцах плазмы крови [1]. Анализ проводится в режиме реального времени без использования дополнительных меток. Показано, что с помощью НП-биосенсора в плазме крови онкологических пациентов могут быть обнаружены микроРНК, ассоциированные с раком молочной железы. Исследованы две системы: (1) буферный раствор, содержащий ДНК-олигонуклеотид (одНК) – синтетический аналог микроРНК, ассоциированной со злокачественной опухолью молочной железы; (2) буферный раствор, содержащий микроРНК, выделенную из плазмы крови. Для выделения миРНК из образцов плазмы крови использовали стандартный набор miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids (10). Поверхность сенсорных элементов была модифицирована ковалентно иммобилизованными одНК-зондами, комплементарными к целевым одНК – рабочие нанопроволоки. Контрольные нанопроволоки были модифицированы молекулярными зондами, не комплементарными целевым одНК. Система (1): буферный раствор (150 мкл, 1 мМ КФБ, pH 7,4), содержащий одНК в концентрационном диапазоне 10-14 - 10-16 М, добавляли в измерительную кювету, содержащую 300 мкл буферного раствора. Конечная концентрация одНК в кювете составляла, соответственно, от 10-15 М до 10-17 М. В контрольных экспериментах в кювету НП-биосенсора добавляли 150 мкл буферного раствора, не содержащего одНК. Система (2): буферный раствор (7 мкл), содержащий образцы микроРНК, выделенные из плазмы крови, добавляли в измерительную кювету, содержащую 200 мкл буферного раствора. В контрольных экспериментах использовали образцы микроРНК из плазмы крови здоровых доноров и больных раком яичника.

С помощью НП-биосенсора (1) проведена регистрация одНК с высокой чувствительностью на уровне 10-17 М в реальном времени без меток, (2) зарегистрирован повышенный уровень микроРНК в исследуемых образцах больных раком молочной железы по сравнению со здоровыми донорами и пациентками с диагнозом рак яичников.



Таким образом, НП-биосенсор может быть использован для выявления перспективных маркеров при онкологических заболеваниях на основе анализа содержания микроРНК в плазме крови.

*Литература:*

1. Ivanov Yu. D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Galiullin R.A., Kurbatov L.K., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Alferov A.A., Kushlinsky N.E., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Detection of marker miRNAs in plasma using SOI-NW biosensor//Sensors and Actuators B. 2018, Vol. 261, P. 566–571.

UDC 621.039.75

## DETECTION OF MIRNA, ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF BREAST CANCER, IN PLASMA WITH A NANOWIRE BIOSENSOR

**Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Ivanov Yu.D., Popov V.P., Kushlinskii N.E., Archakov A.I.**

*Institute of Biomedical Chemistry  
Pogodinskaya st., 10 build. 8, Moscow 119121 Russia  
kristina.malsagova86@gmail.com*

The possibility of use of a nanowire (NW) biosensor for the detection of a DNA oligonucleotide, and a miRNA isolated from plasma, which are associated with the development of breast cancer, in buffer solution has been demonstrated. The concentration detection limit of oDNA attained with the NW biosensor was 10-17M.

**Key words:** breast cancer, miRNA, DNA oligonucleotide, nanowire, nanowire biosensor.

Nanowire biosensor (NW biosensor) allows one to detect protein markers at low concentrations (<10-15 M) in buffer solutions, and also in biological samples (plasma) [1]. The analysis is carried out in real time and is label-free. It has been demonstrated that, using a NW biosensor, miRNAs associated with breast cancer can be revealed in plasma of patients suffering from oncology. Two systems have been investigated: (1) buffer solution containing a DNA oligonucleotide (oDNA) – a synthetic analogue of miRNA associated with breast cancer; (2) buffer solution containing a miRNA isolated from plasma. For the isolation of miRNA from plasma samples, a standard miRCURY RNA Isolation Kit (Biofluids) (10) was used. The surface of sensor elements (working NWs) was modified with covalently immobilized oDNA molecular probes, which were complimentary to the target oDNAs. Control NWs were modified with molecular probes, which were not complimentary to the target oDNAs. System (1): buffer solution (150 µL, 1 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4), containing target oDNA at concentration from 10<sup>-14</sup> to 10<sup>-16</sup> M, was added into the measuring cell of the biosensor, which contained 300 µL of buffer. Accordingly, the final concentration of oDNA in the measuring cell was from 10<sup>-15</sup> M to 10<sup>-17</sup> M, respectively. In the control experiments, 150 µL of buffer without oDNA were added into the cell. System (2): buffer solution (7 µL), containing miRNA isolated from plasma samples, was added into the measuring cell, содержащую which contained 200 µL of buffer. In the control experiments, the samples of miRNA, isolated from plasma of healthy volunteers and patients suffering from ovarian cancer, were used.

With the NW biosensor: (1) the label-free, real-time detection of oDNA with high (10<sup>-17</sup> M) concentration sensitivity has been carried out; (2) elevated miRNA level has been registered in the samples of patients suffering from breast cancer, as compared to those from both healthy volunteers and patients suffering from ovarian cancer.

Thus, the NW biosensor can well be used for the revelation of promising markers of oncological diseases on the basis of the analysis of miRNA level in plasma.

*References:*

1. Ivanov Yu. D., Pleshakova T.O., Malsagova K.A., Kozlov A.F., Kaysheva A.L., Shumov I.D., Galiullin R.A., Kurbatov L.K., Popov V.P., Naumova O.V., Fomin B.I., Nasimov D.A., Aseev A.L., Alferov A.A., Kushlinsky N.E., Lisitsa A.V., Archakov A.I. Detection of marker miRNAs in plasma using SOI-NW biosensor//Sensors and Actuators B. 2018, Vol. 261, P. 566–571.

## ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ В КАЧЕСТВЕ БИОМЕТОК

Горячева И.Ю.

*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012, Саратов, Астраханская 83, goryachevaiy@mail.ru*

Доклад посвящен применению люминесцентных наночастиц (полупроводниковые квантовые точки и наноструктуры на основе углерода) в качестве биометок. Представлены свойства наночастиц, определяющие возможность их эффективного использования, методики синтеза, гидрофилизации и модификации, а так же варианты иммунохимических методов на основе люминесцентных наночастиц для определения различных типов аналитов. Детально рассмотрены ограничения, накладываемые свойствами меток.

Люминесцентные квантовые точки представляют собой полупроводники нанометрового размера, для повышения интенсивности люминесценции покрытые оболочкой более широкозонного полупроводника. Квантовые точки используются как новый класс люминесцентных меток для химического анализа (в первую очередь био- и иммунологического), молекулярной визуализации и биомедицинской диагностики.

Углеродные наночастицы представляют собой относительно новый класс люминесцентных меток. Интерес к ним продиктован простым зачастую одностадийным синтезом, широким спектром доступных источников углерода, отсутствием токсичных компонентов и наличием функциональных групп на поверхности. Основная сложность использования связана с тем, что их строение и свойства не до конца изучены. Кроме того, в ходе синтеза получается совокупность люминесцентных структур с существенно отличающимися свойствами.

Приведены примеры использования люминесцентных наночастиц в анализе, представлены перспективы экспресс-тестов, а также модификации классических методов.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект 14-13-00229) и МОН (проект 4.1063.2017/4.6)

## LUMINESCENT NANOPARTICLES AS BIOMARKERS

Goryacheva I.Yu.

*Saratov State University. N.G. Chernyshevsky, 410012, Saratov, Astrakhanskaya 83, goryachevaiy@mail.ru*

The presentation is devoted to the application of luminescent nanoparticles (semiconductor quantum dots and carbon-based nanostructures) as biomarkers. The properties of nanoparticles, which determine the possibility of their effective usage, the methods of synthesis, hydrophilization and modification, as well as variants of immunochemical methods based on luminescent nanoparticles for the determination of various types of analytes are presented. The constraints imposed by the properties of the labels are considered in details.

Luminescent quantum dots are semiconductors of nanometer size, to increase the luminescence intensity coated with a shell of a more wider-gap semiconductor. Quantum dots are used as a new class of luminescent labels for chemical analysis (mostly bio- and immunochemical), molecular imaging and biomedical diagnostics.

Carbon nanoparticles are a relatively new class of luminescent labels. Interest in them is dictated by a simple one-stage synthesis, a wide range of available carbon sources, the absence of toxic components and the presence of functional groups on the surface. The main complexity of use is due to the fact that their structure and properties are not fully understood. In addition, during the synthesis a set of luminescent structures with essentially different properties is obtained.

Examples of the use of luminescent nanoparticles in the analysis are presented; the prospects of rapid tests, as well as modifications of classical methods are presented.

This work was supported by the RSF (project 14-13-00229) and the Ministry of Education and Science (project 4.1063.2017 / 4.6).

УДК 615.664.54

## МИКРОФЛЮИДНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Губайдуллина М.К., Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия  
 119071, Москва, Ленинский проспект 33  
 e-mail: milya.kamilovna@gmail.com

Для высокочувствительного анализа предложена интеграция подходов микрофлюидики и иммунохроматографии. Разработана геометрия расположения на тест-полоске каналов, формируемых лазерным травлением, и иммунореагентов, обеспечивающая свободный ток пробы и повышение эффективности взаимодействия. На примере детекции антибиотика хлорамфеникола показано пятикратное (до 0,4 нг/мл) снижение предела обнаружения по сравнению с традиционной иммунохроматографией.

**Ключевые слова:** микрофлюидика, иммунохроматография, высокочувствительный анализ.

Бумажная микрофлюидика широко используется в современных разработках аналитических систем. Формирование на бумажных носителях системы каналов позволяет управлять потоками жидкостей, обеспечивая необходимую последовательность и продолжительность взаимодействий при проведении анализа. Однако широкое применение большинства вариантов микрофлюидных аналитических систем ограничивается необходимостью использовать внешние устройства, обеспечивающие движение реагентов. В связи с этим перспективны разработки, в которых аналитические процессы инициируются непосредственно контактом микрофлюидной системы с пробой и не требуют дополнительных воздействий.

Нами предложена интеграция подходов микрофлюидики и иммунохроматографии, то есть проведение анализа на мультимембранной тест-полоске с обеспечением потока реагентов капиллярными силами и модуляции последовательности взаимодействий сформированными на тест-полоске каналами. Формирование микрофлюидной системы на нитроцеллюлозной мембране осуществляется лазерным травлением. Такая обработка поверхности производится бесконтактно и характеризуется высокой точностью и производительностью. При создании программы, управляющей лазерным гравером, были оптимизированы мощность лазера и скорость движения излучающей головки. Анализ основан на принципе иммунохроматографии: в качестве маркера детектируемых иммунных комплексов используется конъюгат специфических антител с золотыми наночастицами, а оценка наличия или отсутствия аналита в пробе осуществляется на основании окрашивания определенной зоны тест-полоски с иммобилизовавшимися в ней иммунными комплексами.

Предложенное микрофлюидное устройство реализовано на примере определения антибиотика хлорамфеникола. В направлении движения жидкости по тест-полоске каналы сужаются, что способствует замедлению потока и увеличению времени взаимодействия реагентов. Выбранная форма канала предотвращает образование обратного тока и застойных зон и позволяет пробе и конъюгату свободно протекать по мембране. Экспериментально установлены оптимальные параметры каналов, а также расположение препятствий для дополнительного замедления потока.

Предел обнаружения хлорамфеникола с помощью предложенной тест-системы составил 0,4 нг/мл, что в пять раз ниже, чем у традиционной иммунохроматографической системы. Продолжительность анализа – 10 минут.

Разработанная система проста в реализации и основана на использовании стандартных реагентов для иммунохроматографии. Формирование системы каналов происходит с высокой производительностью и не требует химической обработки. Универсальность предложенных микрофлюидных решений позволяет использовать их для детекции различных высоко- и низкомолекулярных соединений.

УДК 615.664.54

## MICROFLUID SOLUTIONS FOR INCREASING THE SENSITIVITY OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS

Gubaidullina M.K., Urusov A.E., Petrakova A.V., 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 Prospekt 33  
e-mail: milya.kamilovna@gmail.com*

For highly sensitive analysis, integration of microfluidics approaches and immunochromatography is proposed. The geometry of the location on the test strip is developed for the channels formed by laser etching and immunoreagents; it provides free flow of the sample and increasing the efficiency of interaction. On the example of the detection of chloramphenicol antibiotic, the detection limit was decreased by a factor of five (up to 0.4 ng/ml) as compared with conventional immunochromatography.

**Key words:** microfluidics, immunochromatography, high-sensitive analysis.

Paper microfluidics is widely used in modern developments of analytical systems. The formation of a channel system on paper carriers allows controlling the flow of liquids, providing the necessary sequence and duration of interactions during the analysis. However, the wide application of most variants of microfluidic analytical systems is limited by the need to use external devices that ensure the movement of reagents. In this regard, promising developments are solutions in which analytical processes are initiated directly by the contact of the microfluidic system with the sample and do not require additional influences.

We have proposed the integration of microfluidics and immunochromatography approaches, i.e. (i) implementation of analysis on a multimembrane test strip providing the flow of reagents with capillary forces and (ii) modulation of the sequence of interactions by the channels formed on the test strip. The formation of a microfluidic system on a nitrocellulose membrane is carried out by laser etching. This treatment of surface is non-contact process that is characterized by high accuracy and productivity. The power and speed of the laser radiating head were optimized for programming the laser engraver. The analysis is based on the principle of immunochromatography. A conjugate of specific antibodies with gold nanoparticles is used as a marker of detectable immune complexes. The presence or absence of an analyte in the sample is evaluated based on the staining of a certain zone of the test strip with immune complexes immobilized therein.

The proposed microfluidic device is implemented for the example assay of chloramphenicol antibiotic. In the direction of flow of liquid through the test strip, the channels narrow, which helps to slow the flow and increase the interaction time of the reagents. The selected shape of the channel prevents the formation of reverse flow and stagnant zones and allows the sample and the conjugate to freely flow along the membrane. The optimal parameters of the channels, as well as the location of obstacles for additional flow retardation, were experimentally established.

The detection limit of chloramphenicol with the proposed test system was 0.4 ng/ml, which is five times lower than that of the traditional immunochromatographic system. The duration of the analysis is 10 minutes.

The developed system is easy to implement and is based on the use of standard reagents for immunochromatography. The channels are formed with high productivity and without necessity of chemical treatment. The universality of the proposed microfluidic solutions makes it possible to use them for the detection of various high- and low-molecular compounds.

УДК 621.039.7

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМПРИНТИНГ: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ СПОСОБ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ МОЛЕКУЛЯРНОГО РАСПОЗНАВАНИЯ

**Н. Тарранум**

 Университет Чадхари Чаран Сингх, Меерут 250005 Уттар Прадеш, Индия  
 E-mail: naz1012@gmail.com

Технология с использованием полицивтиттерионов применена для получения молекулярно импринтированных полимеров к L-аспарагиновой кислоте, месаламину, аспартаму, баклофену и фенбуфену. Показана эффективность синтезированных полимеров для распознавания молекул-мишеней в водном растворе. Обнаружено, что полимеры, содержащие молекулярные отпечатки, комплементарные молекулам-шаблонам по размеру и геометрии, характеризуются большей аффинностью к матричной молекуле, чем неимпринтированные полимеры.

**Ключевые слова:** импринтинг, мишень, распознавание, преобразователь

Молекулярный импринтинг полимеров представляет собой полимеризацию мономеров в присутствии молекулы-шаблона с целью создания искусственного отпечатка в полимерной матрице и, таким образом, сохранения структурной информации о молекуле-мишени. Метод искусственного молекулярного распознавания основан на принципе «молекулярный ключ – замок». Схема молекулярного импринтинга включает три стадии: получение НИПа (контрольного неимпринтированного полимера, т.е. полимера без отпечатков для распознавания молекул-шаблонов), аддукта, который представляет собой полимер, способный к связыванию с шаблонами, и молекулярно импринтированного полимера (МИПа) – полимера с отпечатками молекулы-шаблона. Взаимодействие в участках распознавания МИПов может регистрироваться с помощью различных способов – электрохимического, оптического, термоэлектрического, пьезоэлектрического и магнитного.

В последнее время применение технологии молекулярного импринтинга становится все более востребованным благодаря перспективности МИПов как синтетических агентов биологического распознавания. Традиционно в качестве маркеров в диагностике используются природные агенты распознавания – антитела, ферменты, белки и аминокислоты. Биомолекулы обладают высокой специфичностью в отношении молекулы-мишени, но характеризуются высокой нестабильностью. Кроме того, очистка ферментов, антител и аминокислот является методически сложной и долгой процедурой и часто требует дорогостоящего оборудования. Регенерация биомолекул крайне затруднена и значительно ухудшает их активность после нескольких циклов повторного использования, что может привести к снижению точности анализа и увеличению его стоимости. Применение спектрофотометрических и ферментных методов детекции часто затруднено в связи с влиянием компонентов биологических жидкостей на получаемые результаты. Таким образом, МИП-технология является эффективным и мощным аналитическим инструментом, лишенным указанных недостатков.

В данном исследовании технология с использованием полицивтиттерионов впервые применена для получения МИПов к таким молекулам-мишеням, как L-аспарагиновая кислота, месаламин, аспартам, баклофен и фенбуфен. Показана эффективность синтезированных полимеров для распознавания молекул-мишеней в водном растворе. Обнаружено, что МИПы, которые содержат молекулярные отпечатки, комплементарные молекулам-шаблонам по размеру и геометрии, характеризуются большей аффинностью к матричной молекуле, чем НИПы.

UDC 621.039.7

## MOLECULAR IMPRINTING: A POTENTIAL TECHNIQUE TO MEET THE CHALLENGES IN MOLECULAR RECOGNITION

**Nazia Tarannum**

*Department of Chemistry, Chaudhary Charan Singh University, Meerut, Uttar Pradesh, India  
E-mail: naz1012@gmail.com*

In this study, we have approached different polyzwitterionic polymer format for the first time in MIP and the target molecules used for recognition are L-aspartic acid, mesalmine, asparatame, baclofen and fenbufen. The technique was efficient in recognizing the target molecule in aqueous solution. It was found in the study that MIP's have greater affinity for the template molecule than the NIP's because they contain cavities created after the removal of the template complementary to the imprint molecule in size and coordination geometries.

**Key words:** imprinting, target, recognition, transducer

The polymerization of monomers in the presence of target molecule to imprint the structural information and create artificial pocket in the matrix is known as molecular imprinting of polymers (MIP). It is artificial molecular recognition approach based on molecular key and lock principle. The general profile of molecular imprinting includes three stages: non-imprinted polymer (NIP) which is the control polymer or polymer without template recognition pockets; adduct which is a polymer with template binding; MIP which is a polymer with imprinted cavity of template molecule. The recognition pockets are amplified to signals by transducers like electrochemical, optical, thermoelectric, piezoelectric and magnetic.

The application of MIP has gained momentum in recent years due to its role as a biological recognition agent. Biological recognition agents such as antibodies, enzymes, proteins, and amino acids have been used as markers in diagnosis. These molecules are highly specific to the target molecule, but are highly fragile and unstable. Further, purification of enzymes, antibodies and amino acid is tedious and expensive and often requires costly methods. Regeneration of biomolecule is difficult and loose its activity within few reuse cycles. It may lead to inconsistency of accuracy and increases cost per analysis. Spectrophotometric and enzyme detection techniques suffer from interference with compounds present in the biological fluids. Thereby, in order to avoid these shortcomings, MIP may prove to be an efficient and potent analytical tool.

Herein, we have approached different polyzwitterionic polymer format for the first time in MIP and the target molecules used for recognition are L-aspartic acid, mesalmine, asparatame, baclofen and fenbufen. The technique was efficient in recognizing the target molecule in aqueous solution. It was found in the study that MIP's have greater affinity for the template molecule than the NIP's because they contain cavities created after the removal of the template complementary to the imprint molecule in size and coordination geometries.

УДК 577.1

## НОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ БИОСЕНСОРОМ, БИОТЕХНОЛОГИЕЙ И НАНОТЕХНОЛОГИЕЙ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

**М.В. Гаур**

*Хиндустанский колледж науки и технологии, Фарах (Матхура), Уттар Прадеш, 281122 Индия  
E-mail: mulayamgaur@rediffmail.com; Tel: +91-9568006063*

Нанобиосенсорика объединяет нано- и биотехнологию и позволяет разработать чувствительные биосенсоры на основе наноразмерных материалов и биорецепторов. Важным аспектом является разработка электрохимических систем с использованием передатчиков сигнала. Модификация стеклянного электрода специфическими биомолекулами позволит разработать тест-системы для детекции тяжелых металлов.

**Ключевые слова:** нанобиосенсор, аналиты, переносчик, нанотехнология, биотехнология

Нанотехнология в нашем веке является одним из самых важных направлений науки. Она связана с разработкой, конструированием, исследованием и применением систем на наноуровне. Еще одна интересная исследовательская дисциплина текущего дня - это биотехнология, которая дает нам возможность понять биологическую систему и использовать наши знания для промышленного производства. Нанобиосенсоры,

основанные на нанотехнологиях и биотехнологиях, находятся на стыке этих двух областей исследований. Нанобиосенсорика использует нанотехнологию и биотехнологию для анализа и создания нанобиосистем для решения широкого круга задач и разработки широкого спектра приложений. Биосенсор реагирует на концентрацию аналита с точки зрения оптического и электрического сигналов через подходящую комбинацию системы биологического распознавания и преобразователя. В настоящее время научно-технический прогресс в области биосенсора основан на наноматериалах; такие наноустройства, вероятно, будут играть все более важную роль в формировании аналитической информации во всех сферах человеческой деятельности - от медицины до военного дела. В частности, нанобиосенсоры будут составлять основу для недорогих, простых устройств для получения информации о химии, предоставляя сложные аналитические возможности для неспециалистов и обычных граждан. Рыночные возможности для быстрой разработки новых разработок в области нанобиотехнологий являются существенными.

Данный доклад посвящен принципам разработки и изготовления биосенсоров, планированию интерфейса преобразователя при взаимодействии биомолекула-переносчик, модификации чувствительного электрода наноматериалом и биомолекулами, выбора биорецептора (антитело, фермент или аптамер), подходящего для аналита, подготовки и характеристики модифицированных биосенсоров для детекции тяжелых металлов, а также задач на будущее и т. д. Модификация стеклянного углеродного электрода электрохимическим методом с использованием наночастиц сплава Ag-Au для детекции тяжелых металлов в природных водах является особенностью данного доклада. Будущее использование нанобиосенсоров на основе аптамеров также будет обсуждаться с учетом технологий и рынка с учетом нынешнего состояния и перспектив развития.

UDK 577.1

## AN EMERGING INTERFACE BETWEEN BIOSENSOR, BIOTECHNOLOGY AND NANOTECHNOLOGY: PRESENT STATUS AND PROSPECTS

M.S. Gaur

Hindustan College of Science and Technology, Farah, Mathura, Uttar Pradesh, 281122 India  
 Email: mulayamgaur@rediffmail.com; Tel: +91-9568006063

Nanobiosensors based on nanotechnology and biotechnology and allows to develop sensitive biosensors based on nanomaterials and bioreceptors. The main aspect is the development of electrochemical systems with the use of signal transducer. Modification of glassy carbon electrode with biomolecules will allow for designing of biosensors for heavy metals detection.

**Key words:** nanobiosensor, analytes, transducer, aptamers, nanotechnology; biotechnology

Nanotechnology is one of the most important emerging fields of science in this century. It deals with designing, construction, investigation, and utilization of systems at the nanoscale. Another interesting research discipline of current day is biotechnology, which gives us a way to understand biological system and to utilize our knowledge for industrial manufacturing. Nanobiosensors based on nanotechnology and biotechnology lies at the interface of these two research fields. It exploits nanotechnology and biotechnology to analyze and create nanobiosystems to meet a wide variety of challenges and develops a wide range of applications. A biosensor responds to an analyte concentration in terms of optical and electrical signal via a suitable combination of a biological recognition system and a transducer. Currently, scientific and technological progress in the area of biosensor is based on nanomaterial; such nanodevices are likely to play an increasingly important role in generating analytical information in all sectors of human endeavour, ranges from medicine to the military. Specially, nanobiosensors will form the basis of cost, simple devices for acquiring chemical information, bringing sophisticated analytical capabilities to the non-specialist and general public interest. The market opportunities for the rapid exploitation of novel development in the field of nanobiotechnology are substantial.

This talk deals with principles regarding designing and fabrication of biosensor, the planning of the biomolecule-transducer interface design, modification of sensing electrode by nanomaterial and biomolecule, selection of bioreceptor (antibody or enzyme or aptamers) suitable for the analyte, preparation and the characterization of the modified biosensors for detection of the heavy metals, future challenges etc. The modification of glassy carbon electrode by electrochemical method using Ag-Au alloy nanoparticles for detection of heavy metal in real water is an important feature of this talk. The perspective on aptamer-based nanobiosensors and diagnostics will also be discussed in view of technology and market with reference to present status and future prospects.

УДК 535.33/.34 544.72

## НОВЫЕ ПЛАЗМОННЫЕ МЕТКИ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙЯНИЯ ДЛЯ ИММУНОАНАЛИЗА

Хлебцов Н. Г., Хлебцов Б. Н., Пылаев Т. Е., Ханадеев В. А., Браташов Д. Н.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия  
410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13  
e-mail: khlebtsov@ibppm.ru  
Саратовский национальный исследовательский университет им. Н. Г. Чернышевского,  
410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

Предложен количественный мультиплексный вариант иммуноанализа, использующий плазмонные метки гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) с встроенными репортерами. Метод основан на регистрации спектров ГКР от капли аналита на нитроцеллюлозной мембране после инкубации с функционализированными ГКР-метками.

**Ключевые слова:** иммуноанализ, плазмонный резонанс, золотые наночастицы, гигантское комбинационное рассеяние

Недавно были предложены новые типы плазмонных ГКР меток (называемых “gap-enhanced Raman tags” – GERTs [1]), в которых репортерные рамановские молекулы (RM) инкорпорированы внутри наноструктур ядро/оболочка Au@RM@Au [2] или Au@RM@Ag [3]. Благодаря сильным электромагнитным полям в суб- или нанометровых зазорах (полостях) между металлическим ядром и оболочкой [4], общее усиление ГКР сигнала от таких структур может достигать 10<sup>11</sup>. При этом репортерные молекулы защищены от десорбции или изменения внешних условий внешней оболочкой. Использование ярких GERT меток вместо простых коллоидных Au наносфер могло бы повысить эффективность ГКР биоаналитики [5] за счет количественного характера анализа, уменьшения предела детектирования и расширения концентрационного диапазона. Однако, насколько нам известно, метки с встроенными репортерами до сих пор не были использованы в ГКР биоаналитике, в том числе в мультиплексном формате. В данной работе мы описываем мультиплексную версию ГКР дот иммуноанализа, в котором используется три типа меток с молекулами нитробензолтиола, нафталентиола и ацетамидотиофенола, инкорпорированными между ядром и оболочкой Au@RM@Au наночастиц [1]. Для концептуального иллюстративного эксперимента синтезированные GERT метки были функционализированы антикрысиными, античеловеческими и антикуриными антителами и использовались как конъюгаты в ГКР дот иммуноанализе. Благодаря интенсивному и стабильному ГКР сигналу меток мы могли регистрировать спектры репортерных молекул даже при сильном сигнале фона от мембраны. В результате дот иммуноанализ был выполнен в расширенном диапазоне линейной детекции. Возможность мультиплексного анализа продемонстрирована одношаговым определением трех типов молекул мишеней (крысиных, человеческих и куриных IgG) инкубированием в смеси синтезированных конъюгатов. Для решения проблемы повторяемости ответа от точки к точке, мы регистрировали полную рамановскую карту, измеряя ГКР спектры в 2500 точках для каждого пятна на мембране, чтобы получить воспроизводимые и репрезентативные средние спектры.

**Благодарности.** Работа была поддержана грантами РФФИ 16-02-00054, 16-52-45026 и 17-02-00075. Работа В. А. Ханадеева поддержана грантом Президента РФ МК-2617.2017.2

### Литература:

1. Khlebtsov B., Pylaev T., Khanadeev V., Bratashov D., Khlebtsov N. Quantitative and multiplex dot-immunoassay using gap-enhanced Raman tags // *RSC Advances*. 2017. V. 7. P. 40834–40841.
2. Lim D. K., Jeon K. S., Hwang J. H., Kim H., Kwon S., Suh Y. D., Nam J. M. Highly uniform and reproducible surface-enhanced Raman scattering from DNA-tailorable nanoparticles with 1-nm interior gap // *Nat. Nanotechnol.* 2011. V. 6. P. 452-460.
3. Khlebtsov B., Khanadeev V., Khlebtsov N. Surface-enhanced Raman scattering inside Au@Ag core/shell nanorods // *Nano Research*. 2016. V. 9. P. 2303-2318
4. Khlebtsov N. G., Khlebtsov B. N. Optimal design of gold nanomatryoshkas with embedded Raman reporters // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2017. V. 190. P. 89-102.
5. Wang Y., Yan B., Chen L. SERS tags: novel optical nanoprobe for bioanalysis // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. P. 1391-1428.



UDK 535.33/.34 544.72

## NEW PLASMONIC SERS TAGS FOR IMMUNOASSAY

**Khlebtsov N. G., Khlebtsov B. N., Pylaev T. E., Khanadeev V. A., Bratashov D. N.**

*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences  
 Saratov, Russia, 410049, Saratov, prospect Entuziastov, 13  
 e-mail: khlebtsov@ibppm.ru  
 Saratov National Research University named by N.G. Chernyshevsky,  
 410012, Saratov, Astrakhanskaya Street, 83*

We describe a quantitative and multiplex dot immunoassay using plasmonic gap-enhanced Raman tags (GERTs) and nitrocellulose membrane as a substrate. The assay principle is based on reading surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra from analyte drops on the membrane strip after incubation with GERTs conjugated to biospecific probes.

**Key words:** immunoassay, plasmon resonance, gold nanoparticles, surface enhanced Raman scattering (SERS)

Recently, new types of SERS tags were introduced (called gap-enhanced Raman tags – GERTs [2], in which Raman reporters are embedded inside core/shell Au [1] or Au@Ag [2] nanostructures. Owing to high fields inside a nanometer or even subnanometer sized gap between the metallic core and shell [3] the overall enhancement of GERTs can be about 10<sup>11</sup>, while the reporter molecules are protected from desorption and surrounding conditions by the outer metallic shell. The use of efficient SERS tags instead of simple colloidal gold could improve the performance of SERS-based bioanalytic [4] by quantification of the results, decreasing the detection limit, and extension of concentration range. However, to the best of our knowledge, GERTs have not been applied to SERS immunoassay before, especially in a multiplex format. In this work, we describe a multiplex version of SERS dot immunoassay that utilizes three types of GERTs with nitrobenzenethiol, naphtalenethiol, and acetamidothiophenol reporter molecules embedded inside Au@Au core/shell nanoparticles [2]. The fabricated GERTs were functionalized with anti-rat, anti-human and anti-chicken antibodies and used as labels in SERS dot immunoassay. Due to high and stable SERS signal from tags, we were able to record the reporter responses despite strong background Raman signals from membrane. As a result, the dot immunoassay was performed in a quantitative format with expanded range of linear detection. The multiplex capability of the assay is illustrated by a proof-of-concept experiment involving simultaneous one-step determination of target molecules (rat, human, and chicken IgGs) with a mixture of fabricated GERTs conjugates. To fix the point-to-point repeatability problem, which is common for SERS detection on solid substrates, we recorded the whole Raman maps, thus measuring 2500 point spectra for each spot on NCM to obtain the representative average spectrum.

**Acknowledgements.** This work was supported by RFBR grants Nos. 16-02-00054, 16-52-45026 and 17-02-00075. The work by V. A. Khanadeev was supported by a grant from President of Russian Federation MK-2617.2017.2

*References:*

1. Khlebtsov B., Pylaev T., Khanadeev V., Bratashov D., Khlebtsov N. Quantitative and multiplex dot-immunoassay using gap-enhanced Raman tags // *RSC Advances*. 2017. V. 7. P. 40834-40841.
2. Lim D. K., Jeon K. S., Hwang J. H., Kim H., Kwon S., Suh Y. D., Nam J. M. Highly uniform and reproducible surface-enhanced Raman scattering from DNA-tailorable nanoparticles with 1-nm interior gap // *Nat. Nanotechnol.* 2011. V. 6. P. 452-460.
3. Khlebtsov B., Khanadeev V., Khlebtsov N. Surface-enhanced Raman scattering inside Au@Ag core/shell nanorods // *Nano Research*. 2016. V. 9. P. 2303-2318
4. Khlebtsov N. G., Khlebtsov B. N. Optimal design of gold nanomatryoshkas with embedded Raman reporters // *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 2017. V. 190. P. 89-102.
5. Wang Y., Yan B., Chen L. SERS tags: novel optical nanoprobe for bioanalysis // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. P. 1391-1428.

УДК 577.113.5, 54.061, 54.066

## ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ БИОЧИПЫ С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА В КАЧЕСТВЕ МЕТКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Рубцова М.Ю., Преснова Г.В., Филиппова А.А., Уляшова М.М., Егоров А.М.  
Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия  
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3  
e-mail: mrubtsova@gmail.com

Разработан метод мультианализа генов на кремниевых микрочипах с использованием ДНК-мишени, меченной биотином, и конъюгата стрептавидина с наночастицами золота. Детекцию осуществляли подсчетом числа образовавшихся единичных ДНК-дуплексов сканирующей электронной микроскопией.

**Ключевые слова:** мультианализ, олигонуклеотидные микрочипы, кремний, антибиотикорезистентность, бета-лактамазы.

В последние годы метод сканирующей электронной микроскопии успешно применяется для визуализации и характеристики различных биологических объектов. Облучение образца сфокусированным пучком электронов приводит к образованию вторичных и отражённых электронов в результате взаимодействия с веществом носителя. При построении изображения каждой точке образца приписывается яркость, пропорциональная величине сигнала, измеренного в момент, когда пучок находился в этой точке. В последние годы метод СЭМ начал применяться для детекции единичных взаимодействий биомолекул методом подсчета, в том числе с использованием наночастиц в качестве меток.

Целью данной работы являлось применение СЭМ для количественной цифровой детекции нуклеиновых кислот посредством визуализации наночастиц золота (НЧЗ) на поверхности микрочипов низкой плотности из кремния. На микрочипах были иммобилизованы специфические олигонуклеотидные зонды, с ними гибридизовалась ДНК-мишень. Для уменьшения влияния размера метки на конформацию ДНК в ДНК-мишень вводили биотин, который затем выявляли в дуплексах ДНК конъюгатом стрептавидина с НЧЗ. Высокое разрешение СЭМ позволяло проводить визуализацию НЧЗ со средним диаметром 27 нм с хорошим разрешением и контрастом. Это позволило идентифицировать как короткие ДНК-мишени (20 оснований), так и достаточно протяженные (до 800 оснований). Для повышения эффективности гибридизации и разворачивания длинных молекул ДНК-мишени использовали добавление ионов магния и додецилсульфата натрия. Количественное определение ДНК было основано на подсчете плотности НЧЗ, которая была пропорциональна количеству дуплексов. Метод характеризовался высокой чувствительностью, низким уровнем неспецифического связывания и, соответственно, высоким отношением сигнал/фон. При оптимальном разрешении микроскопа коэффициент вариации не превышал 5%. Метод СЭМ был также эффективным инструментом для анализа распределения дуплексов ДНК по поверхности носителя при оптимизации метода иммобилизации специфических зондов.

Разработанный метод был применен для количественного определения нескольких типов генов бактериальных ферментов бета-лактамаз, отвечающих за возникновение устойчивости бактерий к бета-лактамам антибиотикам. Вследствие плазмидной локализации кодирующих их генов количество устойчивых патогенных микроорганизмов, особенно вызывающих внутрибольничные инфекции, быстро растет. Наиболее клинически значимыми являются бета-лактамазы молекулярных классов А и В. В качестве ДНК-мишеней были использованы фрагменты специфических генов бета-лактамазы VIM-1 (молекулярный класс В) длиной 507 пар оснований и бета-лактамаз TEM-1 и CTX-M-3 (молекулярный класс А) длиной, соответственно, 852 и 870 оснований. Предел обнаружения ДНК составил 5 пМ, что существенно ниже предела обнаружения методов с флуоресцентной и колориметрической детекцией. Была также показана эффективность метода для выявления однонуклеотидного полиморфизма в генах.

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФ (Проект № 15-14-00014).

UDK 577.113.5, 54.061, 54.066

## OLIGONUCLEOTIDE BIOCHIPS WITH GOLD NANOPARTICLES AS A LABEL FOR IDENTIFICATION OF GENETIC DETERMINANTS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE

Rubtsova M.Yu., Presnova G.V., Filippova A.A., Ulyashova M.M., Egorov A.M.

*Chemistry Department of M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
 1, 3, Moscow State University, Leninskie Gory, 119991 Moscow, Russia  
 e-mail: mrubtsova@gmail.com*

A method for multianalysis of genes on silicon microchips using target DNA labeled with biotin and a conjugate of streptavidin with gold nanoparticles has been developed. The detection was carried out by counting the number of single DNA duplexes by scanning electron microscopy. The method is characterized by high sensitivity and low level of nonspecific binding.

**Key words:** multiassay, oligonucleotide microarrays, silicon, antibiotic resistance, beta-lactamases

In recent years, scanning electron microscopy (SEM) is being effectively applied for the visualization and characterization of various biological objects. Upon irradiation of the sample by a focused electron beam, the electrons do interact with the surface material, and response signals of different physical nature arise, such as secondary electrons. Single-molecule detection and counting is the new approach in indirect digital detection of proteins by artificial nanoparticle labels. Late studies showed the availability of high resolution SEM for biospecific analysis by the visualization nanoparticles on a support.

The aim of this study was to apply SEM for quantitative digital detection of DNA by visualization of gold nanoparticles (GNPs) on a surface of silicon low density microchips. To reduce the effect of label size on the DNA conformation in a course of hybridization we used biotin for labeling of target DNA which was then developed with streptavidin - GNPs conjugate. The DNA duplexes were formed during a hybridization of target biotin-labeled DNA with specific oligonucleotide probes immobilized on microchip surface. High resolution of SEM enabled well-defined imaging of GNPs of 27 nm which allows the detection of DNA sequences of different length from short (20 bases) to long (from 500 to more than 800 bases) as well. In order to improve the efficiency of hybridization the effect of magnesium ions and sodium dodecyl sulphate on the unrolling of the long DNA molecules was studied. DNA quantification was based on counting GNPs density (the amount of GNPs on surface unit) which was proportional to the amount of DNA duplexes. The method was characterized by high sensitivity, low level of nonspecific binding, and high signal to background ratio. At the optimal microscope resolution coefficient of variation did not exceed 5%. SEM was also effective for the analysis of DNA duplexes density and their distribution on the support surface upon optimization of immobilization technique for oligonucleotide probes.

The method developed was applied for quantitative analysis of several gene types coding bacterial enzymes - beta-lactamases, responsible for the emergence of bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. Due to mainly plasmid localization of genes, the number of resistant human pathogens is growing rapidly, especially among hospital-acquired infections. The most clinically important beta-lactamases are related to the molecular classes A and B. In this work we studied a specific gene of 507 bases coding VIM-1 beta-lactamase (molecular class B) and specific genes of 852 and 870 bases coding TEM-1 beta-lactamase and CTX-M-3 beta-lactamase (both belong to molecular class A). Limit of nucleic acid detection of 5 pM was lower the limits of detection obtained by fluorescent and colorimetric techniques reported earlier. New method revealed not only high sensitivity but also high selectivity for identification of single nucleotide polymorphism in the genes of beta-lactamases.

The work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 15-14-00014).

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПСИНА С ПОМОЩЬЮ ПЬЕЗОКВАРЦЕВОГО СЕНСОРА НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ИМПРИНТИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ

Н.А. Карасева <sup>1</sup>, Т.Н. Ермолаева <sup>1</sup>, Б. Мизайкофф <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Липецкий государственный технический университет», г. Липецк, ул. Московская д. 30, 398600, Россия

e-mail: karaseva\_nadia@mail.ru

<sup>2</sup> Институт аналитической и биоаналитической химии, Университет г.Ульма, г. Ульм, ул. Альберта Эйнштейна 11, 89081, Германия

Наночастицы полимеров молекулярно-импринтированные трипсином (МИП) были синтезированы методом мини-эмульсионной полимеризации. Частицы МИП использовались в качестве распознающего слоя для создания биомиметических пьезокварцевых сенсоров (ПС) для определения трипсина. Получен градуировочный график линейный в диапазоне концентраций 0,125-2,0 мкг-мл<sup>-1</sup> с пределом обнаружения 0,07 мкг-мл<sup>-1</sup>. Разработанный ПС был применен для определения трипсина в фармацевтических препаратах.

**Ключевые слова:** пьезокварцевый сенсор, молекулярно-импринтированный полимер, трипсин

В последние десятилетия, МИПы находят все большее применение в различных областях химического анализа. МИПы применяются в методах твердофазной экстракции, хроматографии и сенсорных технологиях. Особенность МИПов заключается также в том, что они обладают свойствами схожими со свойствами, проявляемыми белками или пептидами в водных средах, что позволяет применять их в медицинской диагностике, клиническом анализе и для контроля качества фармацевтических препаратов [1, 2]

В настоящей работе трипсин использовался в качестве шаблона для создания отпечатков на поверхности наночастиц МИП, иммобилизованных на поверхности ПС, который был применен для контроля качества медицинских препаратов на основе трипсина. Трипсин-импринтированные частицы были синтезированы методом мини-эмульсионной полимеризации, описанным ранее в работе [3].

Формирование распознающего слоя на основе МИП осуществлялось методом спин-коатинг с применением тетрагидрофурана (ТНФ). Суспензия ТНФ: МИП в соотношении 2:1 наносили на центр пьезокварцевого сенсора, вращающегося со скоростью 700-900 rpm. Покрытие, полученное данным методом, выдерживает 8 – 10 циклов измерений без уменьшения аналитического сигнала больше чем на 5%

Значение аналитического сигнала были рассчитано по уравнению:  $\Delta f = \Delta f_{MIP} - \Delta f_{NIP}$ , где  $\Delta f_{MIP}$  и  $\Delta f_{NIP}$  это изменение частоты колебания МИП и НИП-ПС (на основе неимпринтированных полимеров) в Гц. Для построения градуировочного графика применяли растворы трипсина с концентрациями 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, и 2,0 мкг-мл<sup>-1</sup>. Было показано, что аналитический сигнал ПС прямо пропорционален концентрации трипсина в водном растворе. Полученная калибровочная кривая линейна в диапазоне концентраций 0,125-2,0 мкг-мл<sup>-1</sup>, предел обнаружения составил 0,07 мкг-мл<sup>-1</sup>.

МИП-ПС применен для экспрессного анализа содержания трипсина в препарате "trypsinum crystallisatum" ("Самсон-Мед", Россия). Содержание трипсина было определено по полученной ранее калибровочной функции. Концентрация трипсина была также определена спектрофотометрически с целью верификации результатов. Коэффициент вариации составил 3-15%, что показало сопоставимость значений концентраций трипсина, определенных спектрофотометрически и с помощью ПС. Таким образом, была показана возможность применения разработанного ПС.

### Литература:

1. Haupt K. *Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry*// *Analyst*. 2001. 126. P. 747-756
2. Piletsky S. A.; Turner N.W.; Laitenberger P. *Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics - Future potential and existing problems*// *Medical Engineering & Physics*. 2006. 28 (10). P. 971–977.
3. Pluhar B; Ziener U.; Mizaikoff B. *Surface imprinting of pepsin via miniemulsion polymerization*// *J. Mater. Chem. B*. 2013. 1. P. 5489-5495.

## DETECTION OF TRYPSIN VIA PIEZOELECTRIC SENSOR ON THE BASIS OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS

N. A. Karaseva <sup>1</sup>, T.N. Ermolaeva <sup>1</sup>, B.Mizaikoff <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Lipetsk State Technical University, ul. Moskovskaya 30, 398600, Lipetsk, Russia  
 e-mail: karaseva\_nadia@mail.ru

<sup>2</sup> Institute of Analytical and Bioanalytical Chemistry, Ulm University, Albert-Einstein-Allee 11, 89081, Ulm, Germany

Polymer particles imprinted for the protein trypsin were synthesized via miniemulsion polymerization. These particles were used as a molecular recognition element for biomimetic piezoelectric sensors to detect trypsin. The obtained calibration functions corroborated a linear response in a concentration range of 0.125-2.0 µg·mL<sup>-1</sup> with a limit of detection of 0.07 µg·mL<sup>-1</sup>. The developed sensor was tested for the detection of trypsin in pharmaceutical formulations.

**Key words:** piezoelectric sensor, molecularly imprinted polymer, trypsin

In recent decades, application of molecularly imprinted polymers (MIPs) have increased in different analytical methods. MIPs are used in solid-phase extraction, chromatography, and sensor technologies. Increasing interest in MIPs for medical diagnostics, clinical analysis and for the quality control of pharmaceutical formulations [1, 2] can be explained by their unique properties comparable to proteins or peptides in aqueous media.

In the present study, trypsin was used as a template for generating surface imprinted MIP nanobeads that were immobilized at a piezoelectric sensor surface, which was used for the detection of trypsin in pharmaceutical formulations. Trypsin-imprinted particles were synthesized via miniemulsion polymerization, as previously described by the research team [3].

The formation of a recognizing layer on the basis of MIP nanoparticles was carried out by spin-coating with the application of tetrahydrofuran (THF). THF:MIP suspension in the ratio 2:1 was deposited at the center of the piezoelectric sensor in a spin-coating procedure at 700 – 900 rpm. The coatings obtained by this method withstand 8 – 10 measurement cycles without decrease of the analytical signal by more than 5%.

The values of the analytical signal ( $\Delta f$ ) of the developed sensor were estimated according to the following equation:  $\Delta f = \Delta f_{MIP} - \Delta f_{NIP}$ , where  $\Delta f_{MIP}$  and  $\Delta f_{NIP}$  constitute the change of the oscillation frequency of the MIP and the NIP sensor (non-imprinted polymer) in Hz.

Solutions with trypsin concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 µg·mL<sup>-1</sup> were used to establish calibration functions of MIP piezoelectric sensors. It was shown that the analytical signal of the sensor was directly proportional to the concentration of trypsin in aqueous solution. Thus obtained calibration functions provide a linear range at a concentration of 0.125-2.0 µg·mL<sup>-1</sup> with limits of detection of 0.07 µg·mL<sup>-1</sup>.

The developed MIP piezoelectric sensor was applied for detection the concentration of trypsin in “trypsinum crystallisatum” (“Samson-Med”, Russia). The trypsin content was determined using the previously established calibration function. For verification, the trypsin concentration was also determined by UV/Vis spectrophotometry. With the coefficients of variation (CVs) 3 – 15% tolerable differences between the concentrations of trypsin determined by UV-Vis spectrophotometry and MIP piezoelectric sensors were demonstrated, thereby confirming the utility of this innovative sensing concept.

### References:

1. Haupt K. Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry// *Analyst*. 2001. 126. P. 747-756
2. Piletsky S. A.; Turner N.W.; Laitenberger P. Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics - Future potential and existing problems// *Medical Engineering & Physics*. 2006. 28 (10). P. 971–977.
3. Pluhar B; Ziener U.; Mizaikoff B. Surface imprinting of pepsin via miniemulsion polymerization// *J. Mater. Chem. B*. 2013. 1. P. 5489-5495.

УДК 577.1

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОСТРУКТУРНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

П.Р. Соланки

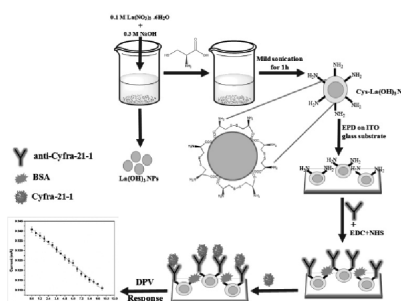
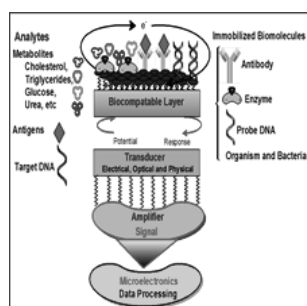
Специальный центр нанонауки, Университет Джавахарлала Неру, Нью Дели-110067 Индия  
E-mail: pratimarsolanki@gmail.com, partima@mail.jnu.ac.in; Tel: +91-11-26704740

Применение различных наноразмерных материалов позволило разработать чувствительные методы определения аналитов. Для разработки чувствительных методов детекции наночастицы были модифицированы L-цистеином. Результаты использования таких наноматериалов продемонстрировали высокую чувствительность при определении онкомаркера.

**Ключевые слова:** квантовые точки, оксид циркония, L-цистеин, биомолекулы, биосенсор, наномедицина

В последние годы повысился интерес к разработке технологий, основанных на наноструктурных материалах, для экспресс диагностики, включая применение для биосенсоров и биоимеджинга. Их уникальные физико-химические свойства - высокая площадь поверхности, растворимость, химический состав, форма, кристаллическая структура, поверхностная энергия, поверхностный заряд, морфология поверхности и поверхностное покрытие и другие, - играют важную роль во взаимодействии с биомолекулами, включая окружающие объекты биологического и экологического происхождения [1-4].

Учитывая это, различные наноструктурные материалы, такие, как оксид циркония, оксид лантана и квантовые точки, были синтезированы и модифицированы аминокислотой L-цистеином для усиления их дальнейшего взаимодействия с биомолекулами для применения в области наномедицины. Результаты этих исследований показали более высокую чувствительность и стабильность. Возможно определять очень низкую концентрацию (ниже физиологического диапазона) биомаркера рака до широкого диапазона детекции (0,001-10,2 нг/мл), низкий предел обнаружения (0,001 нг/мл) и высокую чувствительность - 12.044  $\mu\text{A}$  (нг/мл·см<sup>2</sup>)-1 с временем отклика 5 мин, что может быть полезно для ранней диагностики рака [5].



Литература:

- 1) A.E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova & M. Thompson. *Nature Materials* 8, 2009,543.
- 2) P. K. Gupta, S. Tiwari, Z. H. Khan, P. R. Solanki. *J. Material Chem. B*. 5 (10), 2019
- 3) Y Bagbi, A Sarswat, D Mohan, A Pandey, PR Solanki, *Scientific Reports* 2017, 7.
- 4) P.R.Solanki, A.Kaushik,V.V.Varun, B.D.Malhotra, *NGP Asia Materials* 2011, 3(1),17.
- 5) S. Tiwari, P. K. Gupta, T. Sarkar, Y. Bagbi, P. R. Solanki, *Biosens. Bioelectron.* 2017, 89, 1042.

UDK 577.1

## PROSPECTS OF NANOSTRUCTURED MATERIALS FOR CLINICAL DANOSTICS

P. R. Solanki

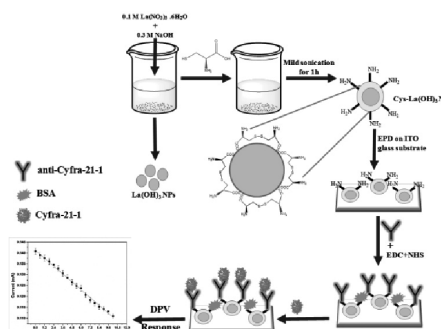
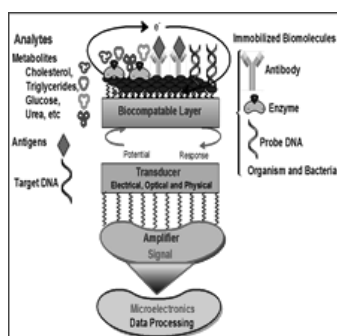
Special Centre for Nanoscience, Jawaharlal Nehru University, New Delhi-110067 India  
E-mail: pratimarsolanki@gmail.com , partima@mail.jnu.ac.in; Tel: +91-11-26704740

Application of various nanomaterials allowed to develop sensitive methods for the detection of analyte. For the development of sensitive methods of detection the synthesized nanoparticles were modified with L-cysteine. The obtained results indicated high sensitivity in cancer biomarker detection.

**Ключевые слова:** quantum dots, zirconium oxide, L-cysteine, biomolecule, biosensor, nanomedicine

There is increased interest towards the development of nanostructured materials based technologies for point-of-care diagnosis including biosensing and bioimaging applications, due to their unique properties. Their physicochemical properties such as high surface area, solubility, chemical composition, shape, crystal structure, surface energy, surface charge, surface morphology, and surface coating etc. play an important role for their interaction with biomolecules including the surrounding materials of biological and environmental [1-4].

Keeping this in view, various nanostructured materials such as zirconium oxide, iron oxide lanthanum oxide and quantum dots have been synthesized and functionalized with the amino acid, L-cysteine to enhance their further interaction with the biomolecules for the nanomedicine applications. The results of these studies found higher sensitivity and stability towards a point of care diagnosis. There is a possibility to detect very low concentration (below the physiological range) of cancer biomarker up to broad detection range of 0.001–10.2 ng mL<sup>-1</sup>, the low detection limit of 0.001 ng mL<sup>-1</sup>, and high sensitivity of 12.044 μA (ng per mL cm<sup>-2</sup>)<sup>-1</sup> with a response time of 5 min that could be helpful for early cancer diagnosis [5].



### References:

- 1) A.E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova & M. Thompson. *Nature Materials* 8, 2009,543.
- 2) P. K. Gupta, S. Tiwari, Z. H. Khan, P. R. Solanki. *J. Material Chem. B.* 5 (10), 2019
- 3) Y Bagbi, A Sarswat, D Mohan, A Pandey, PR Solanki, *Scientific Reports* 2017, 7.
- 4) P.R.Solanki, A.Kaushik,V.V.Varun, B.D.Malhotra, *NGP Asia Materials* 2011, 3(1),17.
- 5) S. Tiwari, P. K. Gupta, T. Sarkar, Y. Bagbi, P. R. Solanki, *Biosens. Bioelectron.* 2017, 89, 1042.

УДК 543.94

## ПЛАНШЕТНЫЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА, СКОНСТРУИРОВАННЫЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

**Бодулев О.Л., Грибас А.В., Колосова А.Ю., Сахаров И.Ю.**

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва Россия  
119991, Москва, Ленинские горы, стр.11  
email: sakharovivan@gmail.com*

В докладе обсуждаются преимущества планшетных вариантов анализа ДНК, созданных с применением олигонуклеотидов. Данный вид анализа требует высокой чувствительности детектирующей системы. Для этого предлагается использовать реакцию усиленной хемилюминесценции, катализируемую пероксидазой, в присутствии фенотиазиновых усилителей.

**Ключевые слова:** нуклеиновые кислоты, хемилюминесценция, планшетный анализ, пероксидаза, конъюгирование

Методы детекции ДНК имеют важное значение в диагностике онкозаболеваний, обнаружения патогенных микроорганизмов и судебно-медицинской экспертизе. Эти методы в большинстве своем основаны на реакции гибридизации. Хотя гомогенные методы анализа ДНК более быстрые и проще в исполнении, гетерогенные методы анализа ДНК более чувствительны и менее подвержены влиянию матричного эффекта изучаемых образцов. В нашей работе мы разработали несколько вариантов планшетных сэндвич методов анализа ДНК, сконструированных с применением различных захватывающих и детектирующих конъюгатов. В качестве модельного анализа была использована ДНК вируса гепатита В. Так как поверхность лунок планшета невелика и фиксирована, нами была применена высокочувствительная система детекции, основанная на реакции усиленной хемилюминесценции с применением фенотиазиновых усилителей в комбинации с N-морфолинопиридином.

Данная работа была поддержана Российским научным фондом (17-14-01042).

UDK 543.94

## MICROPLATE CHEMILUMINESCENT ASSAYS BASED ON OLIGONUCLEOTIDE USE

**Bodulev O. L., Gribas A.V., Kolosova A.Yu., Sakharov I.Yu.**

*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia  
119991, Moscow, Leninsky Gory, bldg. 11  
email: sakharovivan@gmail.com*

In the presentation advantages of application of microplate formats in DNA detection based on oligonucleotide use are discussed. This type of analysis requires high sensitivity of the detection system. For this, it is proposed to use enhanced chemiluminescence reaction catalyzed by peroxidase in the presence of phenothiazine enhancers.

**Key words:** nucleic acids, chemiluminescence, microplate analysis, peroxidase, conjugation

Detection of DNA sequences is of great importance for cancer diagnostics, pathogen determination and forensic analysis. DNA detection techniques are often based on hybridization reaction. Although homogeneous methods are more rapid and simple, heterogeneous methods are more sensitive and less prone to matrix effect in real samples analysis. In our work some formats of microplate sandwich assay for DNA detection with different capture and reporter conjugates have been developed. DNA sequence of hepatitis B virus was used as a model target molecule. Since the surface of microplate wells is limited, the highly sensitive detection system based on HRP-catalysed chemiluminescence with the use of phenothiazine enhancers in combination with N-morpholinopyridine was applied.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 17-14-01042).



УДК 621.039.75

## ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ

**Соболев А. М., Цюпка Д.В., Белоглазова Н.В., Горячева И. Ю.**

*Саратовский Государственный Университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, корп. 1  
 e-mail: aleksandr.m.sobolev@mail.ru*

Получены стабильные иммунореагенты с люминесцентными наночастицами для применения в иммунохроматографическом анализе. Оптимизирована методика проведения конъюгирования иммунореагентов с силанизированными квантовыми точками. Показано специфическое взаимодействие меченого конъюгата с антителами.

**Ключевые слова:** Люминесцентные наночастицы, биоаналитические системы, тест-методы.

Микотоксины оказывают значительное негативное влияние на здоровье человека и могут вызвать различные патологии. Контаминация микотоксинами пищевых продуктов и кормов является важной проблемой и обуславливает необходимость их контроля. Иммунохроматографический анализ с использованием меченых антител обладает высокой чувствительностью, экспрессностью, простотой использования, а также позволяет одновременно определять несколько соединений в исследуемых образцах. Разработана иммунохроматографическая тест-система для одновременного определения дезоксиниваленола (DON) и зеараленона (ZEN) на основе некадмиевых квантовых точек. Для определения двух микотоксинов синтезировали два вида InP/ZnS квантовых точек: оранжевые с максимумом длины волны испускания 609 нм (квантовый выход 40%) и желтые с максимумом длины волны испускания 560 нм и квантовым выходом 60%. Силанизацию поверхности квантовых точек для придания им гидрофильных свойств проводили методом обратной микроэмульсии с последующей функционализацией карбоксил-силаном.

Функциональные карбоксильными группами квантовые точки конъюгировали с анти-ZEN и анти-DON моноклональными антителами карбодимидным методом. В контрольную зону на нитроцеллюлозную мембрану Hi-Flow Plus иммобилизовали анти-мышинные антитела, в тестовые зоны – DON-овальбумин и ZEN- овальбумин. Тест-система позволяет одновременно определять присутствие зеараленона и дезоксиниваленола в кукурузе и пшенице с пределами обнаружения, соответственно, 50 мкг·кг<sup>-1</sup> и 500 мкг·кг<sup>-1</sup> в течение 15 минут. Разработанный тест был апробирован на 13 искусственно зараженных образцах (6 образцов пшеницы и 7 образцов кукурузы).

UDC 621.039.75

## APPLICATION OF FLUORESCENT NANOPARTICLES FOR THE DEVELOPMENT OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS

**Sobolev A.M., Tsyupka D.V., Beloglazova N.V., Goryacheva I.Yu.**

*Saratov State University 83 Astrakhanskaya Street, 410012, Saratov, Russia.  
 e-mail: aleksandr.m.sobolev@mail.ru*

Stable conjugates of luminescent nanoparticles with immunoreagents was developed for immunochromatographic test-systems. A specific interaction of labeled conjugate with antibodies is shown.

**Key words:** Luminescent nanoparticles, bioanalytical systems, test methods.

Mycotoxins have a significant negative impact on human health and may cause a variety of pathologies. The importance of mycotoxin control is based on food and feed contamination. Immunochromatographic assays with fluorescent labels has high sensitivity, rapid detection, ease of use, and provide multiplex determination. An immunochromatographic test system based on a non-cadmium quantum dots were developed for the simultaneous determination of deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN). The synthesis of different color-emitting InP/ZnS quantum dots for determining analytes according to different colors was performed: orange emitting QDs had

an emission peak centered at 609 nm, (photoluminescence quantum yield of 40%), yellow emitting QDs had an emission peak centered at 560 nm and a photoluminescence quantum yield of 60%.

Water-soluble nanoparticles were obtained by quantum dots silanization via a reverse microemulsion method. The surface of quantum dots was functionalized by carboxy- groups. Surface modification of a silica coated QDs by carboxyl- groups allowed to obtain biocompatible nanoparticles.

Carboxyl-functional quantum dots were conjugated with anti-ZEN and anti-DON monoclonal antibodies, respectively, by the carbodiimide method. Anti-mouse antibodies were immobilized in the control zone on the Hi-Flow Plus nitrocellulose membrane, DON-ovalbumin and ZEN-ovalbumin were adsorbed in the test zones. The test system allows simultaneous determination of two mycotoxins in methanol/water extracts from maize and wheat. The developed rapid test is sensitive for DON and ZEN presence at their cutoff levels are 50 µg kg<sup>-1</sup> and 500 µg kg<sup>-1</sup>, respectively. The developed test was validated using 13 naturally-contaminated samples (six wheat and seven maize).

УДК 616-006

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ НАНОБИОСЕНСОРА ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ГИНЕКОЛОГИЧЕСКОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ, СВЯЗАННОГО С ВОЗДЕЙСТВИЕМ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ – ОТ БИОЛОГИИ К КЛИНИКЕ

П.К. Мишра

Департамент молекулярной биологии, Национальный институт исследований в области гигиены окружающей среды (NIREH), Индийский совет медицинских исследований (ICMR)

Бхопал 462 001, Индия

e-mail: pkm\_8bh@yahoo.co.uk

Представлены результаты разработки сенсоров на основе квантовых точек и ферстеровского резонансного переноса энергии для обнаружения циркулирующих нуклеиновых кислот в гинекологических злокачественных новообразованиях, формирование которых обусловлено воздействием окружающей среды. Обсуждаются перспективы применения предложенной стратегии «жидкой биопсии».

**Ключевые слова:** нанобиосенсор, циркулирующие нуклеиновые кислоты, ферстеровский резонансный перенос энергии, квантовые точки.

Распространенность раковых заболеваний женских репродуктивных органов, включая шейку матки, яичники, фаллопиевы трубы, влагалище и вульву, быстро растет в странах с низким и средним уровнем доходов. Большинство этих злокачественных новообразований можно излечить, если диагностировать на ранних стадиях. Для точной диагностики и прогнозирования заболеваний критическое значение имеет выбор контролируемых биомаркеров. Важными биомаркерами онкологических заболеваний стали объекты, циркулирующие таких в жидкостях организма, как плазма, слюна, моча, молоко, семенная жидкость, слезы и амниотическая жидкость. Этот ряд циркулирующих объектов включает высокомолекулярные комплексы, мембранные фрагменты, внеклеточные везикулы, липидные структуры, экзосомы, микровезикулы, ДНК, некодирующие РНК и белки. Наиболее изучены в качестве онкомаркеров циркулирующие нуклеиновые кислоты, ДНК, РНК, микроРНК и митохондриальные ДНК. Убедительно показано функциональное значение внеклеточных циркулирующих нуклеиновых кислот, соответствующих конкретным профилям онкозаболеваний. Исследования циркулирующих нуклеиновых кислот с помощью молекулярных технологий привели к разработке ряда новых лабораторных стратегий. Однако наибольшие инновационные перспективы связаны с разработкой тест-систем диагностического и прогностического назначения, применимых для скрининга групп населения высокого риска. Работы нашей лаборатории сфокусированы на разработке и валидации сенсоров, основанных на использовании квантовых точек и ферстеровского резонансного переноса энергии, для обнаружения циркулирующих нуклеиновых кислот в гинекологических злокачественных новообразованиях, формирование которых обусловлено воздействием окружающей среды. Разрабатываемая нами стратегия может применяться как «жидкая биопсия», полезная для ряда диагностических применений. Более того, предлагаемый метод имеет ряд преимуществ, поскольку периферическая кровь - это легкодоступная биологическая матрица, которую можно забирать от одного и того же человека в разные промежутки времени для мониторинга воздействия сложной генно-экологической ассоциации на рак женских репродуктивных органов.

UDC 616-006

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NANOBIOSENSOR FOR EARLY DIAGNOSIS OF ENVIRONMENTAL ASSOCIATED GYNAECOLOGICAL CANCERS – FROM BIOLOGY TO CLINICAL TRANSLATION

**P.K.Mishra**

*Department of Molecular Biology, National Institute for Research in Environmental Health (NIREH), Indian Council of Medical Research (ICMR)  
 Bhopal 462 001, India  
 e-mail: pkm\_8bh@yahoo.co.uk*

The results of the development of sensors based on quantum dots FRET technology for the detection of circulating nucleic acids in environmental associated gynaecological malignancies is presented. The prospects of applying the proposed strategy of "liquid biopsy" are discussed.

**Key words:** nanobiosensor, circulating nucleic acids, Ferster resonance energy transfer, quantum dots.

The emerging prevalence of cancers originating in the female reproductive organs, including the cervix, ovaries, uterus, fallopian tubes, vagina and vulva are rapidly increasing in low-and middle-income countries with worse outcomes. Majority of these malignancies are curable, if diagnosed at early stages. Candidate biomarkers are therefore essential for accurate disease diagnosis and prognosis. Circulating bio-entities found in body fluids such as plasma, saliva, urine, milk, seminal plasma, tears, and amniotic fluid have emerged as important signatures in cancer. These circulating entities include high molecular weight complexes, membrane fragments, extracellular vesicles, lipid rafts, exosomes, microvesicles, DNA, non-coding RNA and proteins. Among all, circulating nucleic acids (ccf-NAs); DNA, RNA, miRNA and mitochondrial DNA are probably the most extensively studied. The functional significance of cell-free circulating nucleic acids that recapitulate specific cancer profiles is now well established. Characterization of these novel ccf-NAs through molecular technologies has prompted the development of range of laboratory-based strategies, thereby accelerating their broader translational purpose. However, largest opportunity for innovation lies in developing point-of-care tests with accurate diagnostic and higher prognostic score that is applicable for screening of high-risk populations. Our laboratory has made concerted efforts to develop and validate a nanobiosensor based point-of-care test that is based on quantum-dots FRET technology for detection of ccf-NAs in environmental associated gynaecological malignancies. The nanobiosensor based strategy being developed by us can act as a "liquid biopsy", which can be useful for a number of diagnostic applications, notwithstanding the possibility of classical bypass invasive biopsy tissues. Moreover, our method has several advantages as peripheral blood is an easily accessible biological matrix which can be drawn from the same individual at different intervals of time to monitor the impact of the intricate gene-environmental association in female reproductive tract cancers.

## РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУНОАНАЛИЗА МИКОТОКСИНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ И ПЛАНАРНЫХ АНАЛИЗАТОРОВ ИЗОБРАЖЕНИЙ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ЯЧМЕНЯ И 1000 ПРОБ ПИВА

**Питерс Дж., Хааснут В., Нилен М.В.Ф.**

*РИКИЛТ (Институт продовольственной безопасности), Вагенингенский университет и исследовательский центр, Вагенинген, Нидерланды  
 Здание 123, Аккермаалсбос 2, 6708 WB Вагенинген, Нидерланды  
 e-mail: jeroen.peters@wur.nl*

Для выявления контролируемых в ЕС микотоксинов афлатоксина В1, фумонизинов, деоксиниваленола, зеараленона, охратоксина А, Т-2/HT-2 токсина разработан мультиплексный иммуноанализ на основе микросфер. Этот анализ был валидирован как скрининговый анализ для ячменя и применен к 1000 пробам пива из разных стран, преимущественно – крафтового пива, для профилирования микотоксинов.

**Key words:** микотоксины; мультиплексный иммуноанализ; парамагнитные частицы; ячмень; пиво

Микотоксины – вторичные метаболиты, продуцируемые грибами. Их присутствие в продуктах питания и кормах негативно влияет на здоровье людей и животных, и поэтому мониторинг имеет большое значение. Европейский Союз (ЕС) установил законодательные требования к содержанию афлатоксинов (АФ), охратоксина А (ОТА), дезоксиниваленола (ДОН), фумонизинов (Ф), зеоараленона (ЗЕА) и Т-2/НТ-2 токсинов. Существуют различные методы обнаружения микотоксинов, подразделяемые, прежде всего, на методы на основе иммунохимии и хроматографии. Так как часто в пробах встречается несколько микотоксинов одновременно, требуется их мультиплексное обнаружение.

Мультианалитное профилирование (xMAP) – это надежная платформа мультиплексной технологии, в которой используются карбоксилированные полистироловые микросферы, окрашенные включенными внутрь красными и инфракрасными флуорофорами. Варьирование соотношения двух флуорофоров позволяет получить до 500 различных видов микросфер с цветовой кодировкой. Они могут быть объединены с широким спектром биомолекул, таких как нуклеотиды, пептиды, белки, антитела, рецепторы, полисахариды и липиды. Общей репортерной молекулой для всех анализов является R-фикоэритрин. Это позволяет одновременно регистрировать 500 различных биомолекулярных взаимодействий в одной лунке. Поскольку шарики являются парамагнитными, применение в кормах и кормовых матрицах упрощается. Парамагнитные свойства микросфер упрощают выделение аналитов из пищевых и кормовых матриц.

Мы разработали мультиплексный (6-плексный) анализ для микотоксинов, законодательно регулируемых в ЕС. Принцип анализа основан на применении специфических моноклональных антител к микотоксинам, связанных с парамагнитными гранулами xMAP, и смеси специфических репортерных молекул (микотоксины, связанные с R-фикоэритрином). Происходит конкуренция между свободными микотоксинами, присутствующими в пробе, и репортерными микотоксинами за взаимодействие с антителами на микросферах. После этого разделяют 6 видов микросфер из одной лунки и измеряют соответствующие репортерные сигналы. Разработанный 6-плексный скрининговый анализ позволяет легко и быстро обнаруживать микотоксины в ячмене в соответствии с законодательством ЕС. Это было подтверждено в рамках лабораторной валидации с использованием чистых и контаминированных проб ячменя. Для порогового уровня 50%, установленного нормативами ЕС, мы можем выявлять 2 мкг/кг АФВ1, 2,5 мкг/кг ОТА, 625 мкг/кг ДОН, 50 мкг/кг ЗЕА, 1000 мкг/кг ФВ1 и 25 мкг/кг Т-2 токсина. Успешная проверка показала высокую воспроизводимость результатов изменений в течение дня и в разные дни с относительным стандартным отклонением, не превосходящим 10%. Благодаря мобильной системе плоских подложек разработанный анализ имеет потенциал для использования непосредственно в местах отбора проб. Дальнейшее применение этого метода в качестве инструмента предварительного скрининга, предшествующего инструментальному анализу, весьма привлекательно, т.к. оно позволяет избежать дорогостоящего анализа методами ЖХ-МС/МС проб с контаминацией ниже предельно допустимых уровней. Были испытаны и применены дальнейшие усовершенствования, направленные на обеспечение возможности внелабораторного скрининга.

Валидированный мультиплексный анализ был также применен как скрининговое средство контроля микотоксинов в пробах пива. В настоящее время интенсивно возрастает производство крафтового пива, однако обследования его контаминации микотоксинами явно недостаточны. Мы собрали более 1000 проб пива из 47 стран, из которых 60% относились к крафтовому пиву. Выбранные 1000 проб были подвергнуты скринингу на присутствие АФВ1, ОТА, ЗЕА, Ф, Т-2/НТ-2 и ДОН. Подтверждающий анализ мультипараметрическим методом ЖХ-МС/МС выполнялся на выборке из 100 отобранных проб. Основными выявленными микотоксинами были ДОН и его метаболит дезоксиниваленол-3-β-D-глюкопиранозид (ДЗГ). Мультиплексный иммуноанализ показал суммарное содержание ДОН и ДЗГ (ДОН+ ДЗГ) в диапазоне от 10 до 475 мкг/л в 406 пробах, из которых 73% относились к крафтовому пиву. Установлено также, что в 27 пробах крафтового пива содержание ДОН+ ДЗГ достигало или превосходило уровни допустимого дневного потребления. Кроме того, в некоторых пробах пива было подтверждено присутствие Ф, ОТА, Т-2, НТ-2, ЗЕА, 3/15-ацетил-ДОН, ниваленола и конъюгированного микотоксина 14-сульфата ЗЕА.

#### Литература:

1. Peters J, van Dam R, van Doorn R, Katerere D, Berthiller F, Haasnoot W, Nielen MWF. 2017. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLoS ONE* 12(10): e0185887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185887>
2. Peters J, Cardall A, Haasnoot W, Nielen MWF. 2014. 6-Plex microsphere immunoassay with imaging planar array detection for mycotoxins in barley. *Analyst* 139: 3968-3976.
3. Peters J, Thomas D, Boers E, de Rijk T, Berthiller F, Haasnoot W, Nielen MWF. 2013. Colour-encoded paramagnetic microbead-based direct inhibition triplex flow cytometric immunoassay for ochratoxin A, fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405: 7783–7794.
4. Peters J, Bienenmann-Ploum M, de Rijk T, Haasnoot W. 2011. Development of a multiplex flow cytometric microsphere immunoassay for mycotoxins and evaluation of its application in feed. *Mycotoxin Research* 27: 63–72.

## DEVELOPMENT OF MULTIPLEX MYCOTOXIN IMMUNOASSAY USING FLOW CYTOMETRY AND IMAGING PLANAR ARRAY ANALYSERS AND ITS APPLICATION TO BARLEY AND 1000 BEER SAMPLES

**Peters J., Haasnoot W., Nielen M.W.F.**

*RIKILT (Institute of Food Safety), Wageningen University & Research, Wageningen, The Netherlands  
 Building No. 123, Akkermaalsbos 2, 6708 WB Wageningen, The Netherlands  
 e-mail: jeroen.peters@wur.nl*

For the detection of the EU legislated mycotoxins aflatoxin B1, fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2/HT-2 toxin, we developed a bead-based multiplex immunoassay. This bead-based multiplex immunoassay was validated as a screening assay for barley and applied to 1000 global beer samples, with a strong focus on craft beer, for mycotoxin profiling.

**Key words:** mycotoxins; multiplex immunoassay; paramagnetic beads; barley; beer

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi. Their presence in food and feed commodities has a health impact on humans and animals and therefore monitoring is crucial. The European Union (EU) has set legislation for aflatoxins (AFs), ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON), fumonisins (FBs), zearalenone (ZEN) and T-2/HT-2 toxins (T-2/HT-2). Different methods are available for the detection of mycotoxins and, mainly, they can be divided into immunochemistry- and chromatography-based techniques. Since mycotoxins often co-occur, multiplex detection is desired.

MultiAnalyte Profiling (xMAP) is a robust bead-based multiplex technology platform that uses carboxylated polystyrene microspheres (more often referred to as beads) which are internally dyed with red and infrared fluorophores. By varying the ratio of the two fluorophores, up to 500 different color-coded microsphere sets were created. They can be coupled with a wide range of biomolecules like nucleotides, peptides, proteins, antibodies, receptors, polysaccharides and lipids. The general reporter molecule for all assays is R-Phycoerythrin. This allows simultaneous detection of 500 different biomolecular interactions in a single well. Since the beads are paramagnetic the application in food and feed matrices is simplified.

We developed a mycotoxin multiplex (6-plex) for EU legislated mycotoxins. The principle of the 6-plex is based on specific mycotoxin monoclonal antibodies coupled to the paramagnetic xMAP beads and a mixture of mycotoxin specific reporter molecules (mycotoxins coupled to R-phycoerythrin). Competition occurs between the free mycotoxins present in the sample and the mycotoxin-reporter molecules for antibody interaction on the beads. Next, from a single well, the 6 different beads are classified and the corresponding reporter signals measured. The developed 6-plex screening assay allows easy and rapid multiplex detection of the target mycotoxins in barley according to EU legislation. This was proven by a within-laboratory validation using blank and fortified barley samples. With a cut off factor of 50%, based on the EU maximum levels, we were able to screen at 2 µg/kg for AFB1, 2.5 µg/kg for OTA, 625 µg/kg for DON, 50 µg/kg for ZEN, 1000 µg/kg for FB1 and 25 µg/kg for T-2 toxin. The successful validation showed high inter- and intra-day precision for all samples with a maximum relative standard deviation value of 10%. Thanks to the transportable planar array system, the developed 6-plex has potential for future on-site testing. Future implementation of this method as a pre-screening tool, prior to instrumental analysis, is highly attractive since costly LC-MS/MS analysis of samples below the maximum levels can be avoided. Further improvements to benefit portable on-site screening were tested and implemented.

The in-house validated mycotoxin 6-plex was also applied as a screening tool for mycotoxins in beer samples. Currently craft beer is booming, but mycotoxin occurrence surveys focussing on craft beer data are scarce. We collected more than 1000 beers from 47 countries, of which 60% were craft beers. Selected 1000 samples were screened for the presence of AFB1, OTA, ZEN, FBs, T-2 and HT-2, and DON. Confirmatory analysis, using an LC-MS/MS multi-method, was performed on a selection of 100 screened samples. The major mycotoxins detected were DON and its plant metabolite deoxynivalenol-3-β-D-glucopyranoside (D3G). The 6-plex immunoassay reported the sum of DON and D3G (DON+D3G) contaminations ranging from 10 to 475 µg/L in 406 beers, of which 73% were craft beers. Our study showed that in 27 craft beers, DON+D3G concentrations occurred above (or at) the Tolerable Daily Intake (TDI). Furthermore the presence of FBs, OTA, T-2, HT-2, ZEN, β-zearalenol, 3/15-acetyl-DON, nivalenol and the conjugated mycotoxin zearalenone 14-sulfate were confirmed in some beers.

## References:

1. Peters J, van Dam R, van Doorn R, Katerere D, Berthiller F, Haasnoot W, Nielen MWF. 2017. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLoS ONE* 12(10): e0185887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185887>
2. Peters J, Cardall A, Haasnoot W, Nielen MWF. 2014. 6-Plex microsphere immunoassay with imaging planar array detection for mycotoxins in barley. *Analyst* 139: 3968-3976.
3. Peters J, Thomas D, Boers E, de Rijk T, Berthiller F, Haasnoot W, Nielen MWF. 2013. Colour-encoded paramagnetic microbead-based direct inhibition triplex flow cytometric immunoassay for ochratoxin A, fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405: 7783-7794.
4. Peters J, Bienenmann-Ploum M, de Rijk T, Haasnoot W. 2011. Development of a multiplex flow cytometric microsphere immunoassay for mycotoxins and evaluation of its application in feed. *Mycotoxin Research* 27: 63-72.

УДК 543.068.8: 543.63

## РАЗРАБОТКА СТРАТЕГИИ УСИЛЕНИЯ СИГНАЛА ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ТЕТРАЦИКЛИНОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Фарафонова О.В., Ермолаева Т.Н.

ФГБОУ ВО «Липецкий государственный технический университет», Липецк, Россия  
398055, Липецк, ул. Московская, д. 30, кафедра химии  
e-mail: farafonova.ov@mail.ru

Разработана стратегия амплификации сигнала пьезоэлектрического сенсора для определения остаточных концентраций тетрациклинов в пищевой продукции путем формирования высокоаффинного наноструктурированного распознающего покрытия, на основе смешанного монослоя тиолов и утяжеления молекул антител за счет присоединения наночастиц золота или вторичных антител.

**Ключевые слова:** пьезоэлектрический иммуносенсор, распознающий слой, тетрациклиновые антибиотики.

Предложена стратегия усиления сигнала пьезоэлектрического гравиметрического иммуносенсора для определения тетрациклинов, основанная как на увеличении концентрации «сайтов» связывания на поверхности распознающего слоя сенсора, так и утяжелении молекул антител на счет присоединения наночастиц золота или вторичных антител. Показано, что одновременное применение при формировании распознающего слоя линейного (11-меркаптоундеканола) и гетероциклического (2-амино-5-меркапто-1,3,4-триазола) тиолов способствует существенному увеличению аналитического сигнала сенсора при определении субнанолярных концентраций тетрациклина в конкурентном формате иммуноанализа.

В тоже время, применение в проточно-инжекционном формате анализа наночастиц золота, диаметром  $7 \pm 2$  нм, полученных в обратных микроэмульсиях путем восстановления золотохлористоводородной кислоты, или вторичных антител снижает предел обнаружения тетрациклина с 0,007 до 0,0009 нг/мл, а хлортетрациклина с 6,4 до 0,2 нг/мл. Кроме того, использовании наночастиц золота для групп-специфического определения тетрациклинов позволяет достичь более широкий диапазон определяемых содержаний по сравнению с применением вторичных антител.

Разработанные иммуносенсоры апробированы при определении тетрациклинов в мясе, рыбе, креветках, яйцах, меде, молоке и сыре. Выявлено существенное превышение МДУ тетрациклинов (400 мкг/кг) в королевских креветках.

UDC 543.068.8: 543.63

## STRATEGY DEVELOPMENT OF PIEZOELECTRIC IMMUNOSENSOR SIGNAL AMPLIFICATION TO DETERMINE RESIDUAL TETRACYCLINE CONCENTRATIONS IN FOOD PRODUCTS.

**Farafonova O.V., Ermolaeva T.N.**

"Lipetsk State Technical University", Lipetsk, Russia  
 398055, Lipetsk, st. Moscow, 30, Department of Chemistry  
 e-mail: farafonova.ov@mail.ru

A strategy for piezoelectric sensor signal amplification to determine the residual tetracycline's concentrations in food products is developed by forming a high affinity nanostructured recognition coating based on a mixed monolayer of thiols and weighting the antibody molecules by attaching gold nanoparticles or secondary antibodies.

**Key words:** piezoelectric immunosensor, recognition layer, tetracycline antibiotics.

A strategy for amplifying the signal of a piezoelectric gravimetric immunosensor for the determination of tetracycline's is proposed, based both on an increase in the concentration of "binding sites" on the sensor recognition layer surface and on the weighting of antibody molecules on the addition of gold nanoparticles or secondary antibodies. It is shown that the simultaneous application of linear (11-mercaptoundecanol) and heterocyclic (2-amino-5-mercapto-1,3,4-triazole) thiols during the formation of the recognition layer promotes a significant increase in the analytical signal of the sensor in determining subnanomolar concentrations of tetracycline in a competitive immunoassay format.

At the same time a flow-injection analysis format with gold nanoparticles, diameter of  $7 \pm 2$  nm, obtained in reverse microemulsions by reduction of chloroauric acid, or secondary antibodies reduces the detection limit of tetracycline from 0.007 to 0.0009 ng/ml, and chlorotetracycline with 6.4 to 0.2 ng/ml. In addition, the use of gold nanoparticles for group-specific determination of tetracyclines makes it possible to achieve a wider range of detectable contents compared with the use of secondary antibodies.

Developed immunosensors are tested for tetracyclines determination in meat, fish, shrimp, eggs, honey, milk and cheese. A significant excess of MRL of tetracyclines (400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in royal prawns was detected.

УДК 68.41.41

## РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССНОГО ТЕСТА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО МАРКЕРА С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА У СОБАК

**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, стр. 2  
 e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru

Разработана иммунохроматографическая тест-система для выявления воспалительного маркера С-реактивного белка в сыворотке крови собак. Определены ее аналитические параметры: предел обнаружения – 2 мкг/л, продолжительность анализа – 10 минут. Проведена апробация разработанной тест-системы на клиническом материале, показана корреляция с результатами, получаемыми методом иммуноферментного анализа.

**Ключевые слова:** воспалительные маркеры, С-реактивный белок собак, иммунохроматография, экспрессная диагностика

С-реактивный белок (СРБ) относится к биомаркерам острой фазы воспаления. Его синтез возрастает при воспалении, бактериальных инфекциях, повреждении тканей. СРБ синтезируется гепатоцитами и секретируется в кровь. При развитии воспаления синтез и секреция СРБ начинают увеличиваться уже через несколько часов после возникновения воспалительного стимула и достигают максимального значения (100-200 мг/л) через 24-48 часов. После купирования воспалительного процесса концентрация СРБ в крови быстро снижается до нормального уровня (1-10 мг/л). Измерение концентрации СРБ в крови собак используется для диагностики и наблюдения за ходом воспалительного процесса. Поэтому средства экспрессной детекции СРБ крайне востребованы в как в

медицине, там и в ветеринарии, причем тесты ветеринарного назначения должны учитывать антигенные особенности СРБ животных данного вида.

На основе моноклональных антител фирмы «Биалекса» (Москва, Россия) разработана иммунохроматографическая тест-система для выявления СРБ у собак в «сэндвич»-формате, основанном на формировании комплексов (иммобилизованное антитело) – (антиген в пробе) – (конъюгат антител с частицами коллоидного золота).

В рамках разработки получены препараты коллоидного золота со средним диаметром 34 нм и их конъюгаты с антителами против СРБ собак. 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 СРБ.

Проведена апробация тест-системы на клиническом материале (сыворотках крови больных и здоровых собак). Показано, что предел обнаружения СРБ в сыворотке крови составляет 2 мкг/л, рабочий диапазон количественного определения – от 10 до 100 мкг/л, диагностическая чувствительность – 96%, диагностическая специфичность – 97%, точность определения уровня СРБ при фотометрической регистрации результатов анализа – 2-6%. Продолжительность анализа – 10 минут.

Показана корреляция результатов, получаемых с помощью разработанной тест-системы и иммуноферментного анализа, традиционно используемого в ветеринарной медицине для определения СРБ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-01397\_а).

UDC 68.41.41

## DEVELOPMENT OF RAPID TEST FOR THE DETECTION OF INFLAMMATORY MARKER OF C-REACTIVE PROTEIN IN DOGS

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

*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamental Foundations of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
119071, Moscow, Leninsky prospect, 33, building 2  
e-mail: nbyzova@inbi.ras.ru*

An immunochromatographic test system was developed to detect C-reactive protein, an inflammatory marker, in blood serum of dogs. Its analytical parameters were determined: limit of detection – 2 µg/l, duration of analysis – 10 min. Aprrobation of the developed test-system on a clinical material is carried out. The correlation with the results obtained by enzyme immunoassay is shown.

**Key words:** inflammatory markers, C-reactive protein of dogs, immunochromatography, rapid diagnostics

C-reactive protein (CRP) belongs to biomarkers of the acute phase of inflammation. Its synthesis increases in cases of inflammation, bacterial infections, damage of tissues. CRP is synthesized by hepatocytes and secreted into blood. With the development of inflammation, the synthesis and secretion of CRP begin to increase a few hours after the onset of the inflammatory stimulus and reach a maximum value (100–200 mg/l) after 24–48 hours. After suspending the inflammatory process, the concentration of CRP in blood rapidly decreases to a normal level (1–10 mg/l). Measurement of the concentration of CRP in blood of dogs is used to diagnose inflammatory processes and monitor them. Due to this, tools for rapid detection of CRP are highly demanded in veterinary, and veterinary tests should take into account the antigenic characteristics of CRP of concrete species.

Based on the monoclonal antibodies of Bialexa (Moscow, Russia), an immunochromatographic test system was developed to detect CRP in dogs. The assay was realized in sandwich format that is based on the formation of (immobilized antibody) – (antigen in the sample) – (conjugate of antibodies with colloidal gold particles) complexes.

In the course of the development, preparations of colloidal gold with an average diameter of 34 nm and their conjugates with anti-CRP antibodies were obtained. The antigen-binding ability of the conjugates of different composition was compared. The processes of detectable complexes formation during immunochromatography were characterized using various membrane carriers. The conditions for applying immunoreagents to membranes and their concentrations were established, which ensure a minimum limit of the detection of CRP.

Aprrobation of the test system on clinical material (sera of diseased and healthy dogs) was carried out. The limit of detection of CRP in blood serum is 2 µg/l, the working range of the quantitative determination – from 10 to 100 µg/l, diagnostic sensitivity – 96%, diagnostic specificity – 97%, the accuracy of determining CRP for photometric



registration of the analysis results – 2 -6%. The duration of the analysis is 10 min.

Correlation of the results obtained by the developed test system and the enzyme immunoassay, traditionally used in veterinary for the determination of CRP, was shown.

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-08-01397\_a).

УДК 543

## СОЗДАНИЕ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСКОЛЬКИХ АНТИБИОТИКОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Еремин С.А. <sup>1</sup>, Шанин И.А. <sup>1</sup>, Кострикина Е.С. <sup>2</sup>, Лебедин Ю.С. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия 119991, Москва, Ленинские горы, 1  
 e-mail: eremin\_sergeri@hotmail.com

<sup>2</sup> ООО «ХЕМА»  
 105264, Москва, 9-я Парковая ул., 48

Рассмотрены последние достижения по разработке и применению иммуноферментного анализа (ИФА) и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) для простого и быстрого определения антибиотиков в пищевых продуктах.

**Ключевые слова:** антибиотики, иммуноферментный анализ

Антибиотики являются одними из основных загрязнителей пищевых продуктов. Применяется большое количество разнообразных антибиотиков, прежде всего хлорамфеникол, сульфамидные препараты, фторхинолоны, тетрациклин, пенициллин и другие вещества. Все антибиотики достаточно устойчивы и не разрушаются даже при термической обработке, и вследствие этого загрязнение ими пищевых продуктов несет серьезную опасность здоровью человека. Для контроля содержания антибиотиков в продуктах питания необходимо применять с одной стороны – точные и высокочувствительные методы анализа, и с другой стороны, методы должны быть простыми и быстрыми, чтобы проводить большое количество тестов и определять разнообразные вещества. Для этих целей наиболее подходят иммунохимические методы, основанные на применении антител – натуральных белковых распознающих веществ, вырабатываемых защитной иммунной системой животных.

Нами получены необходимые иммунореагенты и оптимизированы методики - ИммуноФерментный Анализ (ИФА) и Поляризационный Флуоресцентный ИммуноАнализ (ПФИА) на антибиотики – хлорамфеникол, ампициллин и фторхинолоны. Пробоподготовка пищевых образцов и схемы проведения иммуноанализов синхронизированы, что позволило проводить иммуноанализы в параллельном режиме для определения нескольких антибиотиков.

Разработка выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.604.21.0198 от 26.09.2017; уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0198.

УДК 543

## DEVELOPMENT OF IMMUNOCHEMICAL TEST-SYSTEMS FOR PARALLEL DETERMINATION OF MULTIPLE ANTIBIOTICS IN FOODSTUFFS

Eremin S.A. <sup>1</sup>, Shanin I.A. <sup>1</sup>, Kostrikina E.S. <sup>2</sup>, Lebedin Yu.S. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> M.V. Lomonosov Moscow State University  
 Leninskie gory 1, 119991 Moscow, Russia  
 e-mail: eremin\_sergeri@hotmail.com

<sup>2</sup> XEMA Company Limited  
 Ninth Parkovaya street 48, 105264 Moscow, Russia

Recent developments in the development and use of enzyme immunoassay (ELISA) and polarization fluorescent immunoassay (PFIA) are considered for simple and rapid determination of antibiotics in food.

**Key words:** antibiotics, enzyme immunoassay

Antibiotics are one of the main pollutants of food. A large number of various antibiotics are used, primarily chloramphenicol, sulfa drugs, fluoroquinolones, tetracycline, penicillin and other substances. All antibiotics are sufficiently stable and do not break down even during heat treatment, and as a consequence, their contamination of food products poses a serious threat to human health. To control the content of antibiotics in foodstuffs, it is necessary to apply precise and highly sensitive methods of analysis on the one hand, and on the other hand, the methods should be simple and fast to conduct a large number of tests and to determine a variety of substances. For these purposes, the most suitable immunochemical methods based on the use of antibodies - natural protein recognition substances, produced by the protective immune system of animals.

We obtained the necessary immunoreagents and optimized immune methods – Immunoassay Analysis (ELISA) and Polarization Fluorescent ImmunoAnalysis (PFIA) for antibiotics - chloramphenicol, ampicillin and fluoroquinolones. Sample preparation of food samples and immunoassay schemes were synchronized, which allowed carrying out the immunoassays in parallel mode for the determination of several antibiotics.

This investigation was financially supported by the Russian Ministry of Education and Science (contract 14.604.21.0198 from September 26, 2017; unique identifier of applied research: RFMEFI60417X0198).

УДК 57.083.3

## ТЕХНОЛОГИЯ СИНТЕЗА УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ И ДНК-АПТАМЕРОВ

**Храмцов П.В., Кропанева М.Д., Калашникова Т.В., Раев М.Б.**

*Лаборатория экологической иммунологии «Институт экологии и генетики УрО РАН», г. Пермь, Россия  
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13, к. 15. E-mail: khramtsov Pavel@yandex.ru*

Разработан метод синтеза конъюгатов углеродных наночастиц и ДНК-аптамеров, сохраняющих свои свойства при длительном хранении. Конъюгаты могут быть использованы для создания гетеро- и гомогенных колориметрических, флуоресцентных тест-систем, а также диагностических систем, основанных на феномене агрегации наночастиц.

**Ключевые слова:** аптамеры, углеродные наночастицы, стабильность

Аптамеры – это короткие молекулы ДНК или РНК, способные специфически распознавать различные мишени: молекулы, клетки и даже ионы [1, 2]. Взаимодействие аптамеров с мишенью осуществляется посредством водородных, ионных, гидрофобных взаимодействий, а также стэкинга, что напоминает взаимодействие антигенов и антител [3]. Наночастицы аморфного углерода (УНЧ) обладают целым рядом физико-химических свойств, обуславливающих их применение при разработке колориметрических [4], электрохимических [5] и флуоресцентных [6] диагностических систем.

Задачи исследования: 1) оптимизировать синтез конъюгатов углеродных наночастиц и ДНК-аптамеров, 2) исследовать их стабильность при хранении и разработать меры по ее улучшению, 3) изучить устойчивость иммобилизованных аптамеров к воздействию нуклеаз и изменениям pH среды.

По итогам выполнения исследования была разработана и оптимизирована технология синтеза конъюгатов УНЧ и ДНК-аптамеров на основе взаимодействия биотин-стрептавидин. Высокая стабильность и физико-химические свойства модифицированных наночастиц позволяют использовать их при создании гетеро- и гомогенных колориметрических, флуоресцентных тест-систем, а также диагностических систем, основанных на феномене агрегации наночастиц. Технология позволяет иммобилизовать порядка 100–120 пМ биотинилированных ДНК-олигонуклеотидов на 1 мг УНЧ, конъюгированных со стрептавидином (УНЧ-Стр) и получать суспензии наночастиц с массовой долей УНЧ-аптамер 2–3 мг/мл и более. Зета-потенциал функционализированных аптамерами УНЧ составляет –34 мВ при pH 7, их средний гидродинамический диаметр равен  $174.2 \pm 0.5$  нм а индекс полидисперсности –  $0.092 \pm 0.014$ . Воспроизводимость технологии получения конъюгатов продемонстрирована при помощи сравнения свойств трех различных партий конъюгата, синтезированных с использованием различных партий родительских наночастиц УНЧ-Стр. Технология была с успехом использована для синтеза конъюгатов УНЧ с аптамерами, имеющими различную вторичную структуру: петлевую и G-квадруплексную. Продемонстрировано, что добавление ЭДТА в готовый конъюгат предотвращает разрушение иммобилизованных ДНК-аптамеров нуклеазами, находящимися в среде и обеспечивает полную сохранность их функциональных свойств в течение одного месяца при хранении при +4°C и –20°C в виде концентрированных суспензий в нейтральном фосфатном буфере. В ходе хранения не наблюдалось ни агрегации наночастиц, ни десорбции аптамеров с их поверхности. Конъюгированные с аптамерами УНЧ были стабильны в диапазоне pH от 6 до 10 включительно. Кроме того, в ходе работы была продемонстрирована способность УНЧ-Стр к гашению флуоресценции

иммобилизованных биотинилированных аптамеров, меченых карбоксифлуоресцеином.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Пермского края, грант p\_a 16-44-590427.

Литература:

1. Crivianu-Gaita V., Thompson M. *Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements*//*Biosensors and Bioelectronics*. 2016. V. 85. P. 32-45.
2. Zhou W., Saran R., Liu J. *Metal Sensing by DNA*//*Chemical Reviews*. 2017. V. 117. №. 12. P. 8272-8325.
3. Zhou J., Rossi J. *Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges*//*Nature Reviews Drug Discovery*. 2017. V. 16. №. 3. P. 181-202.
4. Posthuma-Trumpie G.A., Wichers J.H., Koets M., Berendsen L.B.J.M., Van Amerongen A. *Amorphous carbon nanoparticles: A versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays*//*Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. V. 402. №. 2. P. 593-600.
5. Silva T.A., Moraes F.C., Janegitz B.C., Fatibello-Filho O., Ganta D. *Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: A review*//*Journal of Nanomaterials*. 2017. art. no. 4571614.
6. Ding S., Cargill A.A., Das S.R., Medintz I.L., Claussen J.C. *Biosensing with Förster resonance energy transfer coupling between fluorophores and nanocarbon allotropes*//*Sensors (Switzerland)*. 2015. V. 15. №. 6. P. 14766-14787.

UDK 57.083.3

## METHOD OF SYNTHESIS OF CARBON NANOPARTICLES–APTAMER CONJUGATES

**Khrantsov P.V., Kropaneva M.D., Kalashnikova T.V., Rayev M.B.**

Laboratory of ecological immunology, «Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms», Perm, Russia  
614081, 13, Goleva str., Perm, E-mail: khrantsovpavel@yandex.ru

A method of synthesis of highly stable carbon nanoparticles-DNA aptamer conjugates with was developed. Superior stability and physical-chemical properties of conjugates stipulates possibility of their application in both homo- and heterogeneous colorimetric, fluorescent and aggregation-based assays.

**Key words:** aptamers, carbon nanoparticles, stability

Aptamers are short DNA and RNA molecules with ability to specifically recognize various targets: molecules, cells and even ions [Crivianu-Gaita, 2016, Zhou W, 2017]. Binding to the target is carried out through hydrogen, ionic, hydrophobic interactions, base stacking: quite similar to that of antibody and antigen [Zhou J, 2017]. Amorphous carbon nanoparticles (CNP) possess a bunch of physical-chemical properties stipulating their application in development of colorimetric [Posthuma-Trumpie, 2012], electrochemical [Silva, 2017] and fluorescent assays [Ding, 2015].

The goals of this study are: 1) optimization of synthesis of CNP-DNA aptamer conjugates, 2) investigation and improvement of their storage stability, 3) examination of their resistance to nucleases and pH alterations.

The technology of carbon nanoparticles (CNP) with DNA aptamers synthesis based on biotin-streptavidin interaction was optimized. Superior stability and physical-chemical properties of conjugates stipulates possibility of their application in both homo- and heterogeneous colorimetric, fluorescent and aggregation-based assays. Method allows loading of about 100-120 pM of biotinylated aptamer per 1 mg of streptavidin-coated CNP (CNP-Str). Resulted suspensions with CNP concentration about 2-3 mg/ml have zeta potential of  $-34$  mV at pH 7, mean diameter of  $174.2 \pm 0.5$  nm and polydispersity index of  $0.092 \pm 0.014$ . High reproducibility of functionalization was confirmed by preparation of several batches of CNP-aptamer with the same size distribution and aptamer loading using independently synthesized parent CNP-Str nanoparticles. Technology was successfully utilized to prepare conjugates with DNA aptamers having different secondary structures: loop and G-quadruplex. It was shown that post-synthesis addition of EDTA prevents nuclease degradation of immobilized aptamers and provides preservation of functional properties for at least 1 month during storage at  $+4^\circ\text{C}$  and  $-20^\circ\text{C}$  in the form of concentrated suspensions in neutral phosphate buffer. No aggregation of CNP-aptamer or aptamer loss was observed during storage. Obtained nanoparticles were stable at pH ranged from 6 to 10. Fluorescence quenching ability of CNP-Str towards FAM-labeled biotinylated aptamers were demonstrated.

The study was conducted under financial support of Russian Foundation for Basic Research and Government of Perm Krai, scientific project p\_a 16-44-590427.

## References:

1. Crivianu-Gaita V., Thompson M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements//*Biosensors and Bioelectronics*. 2016. V. 85. P. 32-45.
2. Zhou W., Saran R., Liu J. Metal Sensing by DNA//*Chemical Reviews*. 2017. V. 117. №. 12. P. 8272-8325.
3. Zhou J., Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges//*Nature Reviews Drug Discovery*. 2017. V. 16. №. 3. P. 181-202.
4. Posthuma-Trumpie G.A., Wichers J.H., Koets M., Berendsen L.B.J.M., Van Amerongen A. Amorphous carbon nanoparticles: A versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays//*Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. V. 402. №. 2. P. 593-600.

УДК 543.544.9

## ЭКСПРЕССНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ В МЕМБРАННЫХ МИКРОФЛЮИДНЫХ СИСТЕМАХ

**Дзантиев Б.Б.**

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: dzantiev@inbi.ras.ru

Рассмотрены способы снижения предела детекции и повышения продуктивности мембранного иммунохроматографического анализа, основанные на управлении порядком и продолжительностью взаимодействий реагентов. Показано, как изменение геометрии тест-систем, формирование дополнительных каналов влияет на параметры анализа. Охарактеризованы варианты мультипараметрической иммунохроматографии.

**Ключевые слова:** иммуноанализ, иммунохроматография, микрофлюидика, комплексы антиген-антитело, мультиплексные аналитические системы

Имунохроматографические тест-полоски являются распространенным средством экспрессного выявления разнообразных соединений в медицине, ветеринарии, экологическом мониторинге и контроле потребительской продукции. Принципиальное достоинство иммунохроматографии – простота проведения анализа. Контакт тест-полоски с пробой инициирует движение фронта жидкости по мембранам тест-полоски, обеспечивающее все взаимодействия аналитических реагентов. Однако зависимость времени реакции от скорости движения потока и свойств мембранных носителей снижает количество формирующихся детектируемых комплексов, ухудшает чувствительность иммунохроматографии по сравнению с другими видами иммуноанализа.

В докладе представлены разработки, направленные на регулирование порядка взаимодействий в ходе иммунохроматографии и реализующие на мембранных носителях подходы микрофлюидики. Разработки осуществлялись на примерах определения соединений различных физико-химических свойств и молекулярной массы – микотоксинов, кардиомаккеров (миоглобин, тропонин), белков-маккеров воспалительных процессов (С-реактивный белок, прокальцитонин). Формирование дополнительных каналов и резервуаров позволяет изменить соотношение реагентов, последовательность и продолжительность взаимодействий между ними и тем самым влиять на стадии иммунохроматографического процесса, лимитирующие снижение предела детекции и время анализа. Для модуляции порядка протекания иммунохимических реакций может быть использовано замедленное высвобождение реагентов их дополнительных мембран, пропитанных вязкими компонентами. Показано, что перенесение специфических антител в раствор для разбавления пробы позволяет за время короткой прединкубации (1 мин и менее) приблизить к равновесию формирование иммунных комплексов с аналитом в пробе и тем самым снизить предел обнаружения на порядок по сравнению с традиционным связыванием всех аналитических реагентов в потоке. На примере системы для высокочувствительной детекции прокальцитонина рассмотрены процессы формирования комплексов из нескольких видов конъюгатов наночастиц, усиливающих регистрируемый оптический сигнал. Обсуждаются возможности реализации мультипараметрического анализа на одной тест-полоске, требования к геометрии нанесения аналитических реагентов разной специфичности.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-01131).

UDC 543.544.9

## RAPID IMMUNOASSAYS IN MEMBRANE MICROFLUIDIC SYSTEMS

**Dzantiev B.B.**

*A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center "Fundamental Foundations of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
Leninsky prospect 33, 119071 Moscow, Russia  
e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

Methods for lowering the detection limit and increasing the productivity of membrane immunochromatographic assay are considered. They are based on regulation of sequence and duration for interactions between analytical reagents. It is shown how the change in the geometry of the test-systems, and the formation of additional channels affect the assay parameters. Variants of multiparametric immunochromatographic assays are characterized.

**Key words:** immunoassay, immunochromatography, microfluidics, antigen-antibody complexes, multiplex analytical systems

Immunochromatographic test strips are common tools for rapid detection of various compounds in medicine, veterinary, environmental monitoring and consumers' protection. The principal advantage of immunochromatography is the simplicity of the analysis. Contact of the test strip with a sample initiates the movement of liquid front along the test strip membranes, ensuring all interactions of analytical reagents. However, the dependence of the reaction time on the flow velocity and the properties of the membrane carriers reduces quantity of formed detectable complexes, causes a worse sensitivity of immunochromatography as compared to other types of immunoassay.

The report presents developments that are aimed at regulating the sequence of interactions during immunochromatography and realize approaches of microfluidics on membrane carriers. Developments were carried out using examples of the determination of compounds having various physico-chemical properties and molecular weight: mycotoxins, cardiomarkers (myoglobin, troponin), inflammatory markers (C-reductive protein, procalcitonin). The formation of additional channels and reservoirs allows changing the ratio of reagents, the sequence and duration of interactions between them. This influence affects the stages of the immunochromatographic process, which do not allow reducing the detection limit. As an approach to modulate the sequence of immunochemical reactions, a delayed release of reagents from additional membranes impregnated with viscous components can be used. It was shown that the transfer of specific antibodies to the solution for sample dilution allows, in a short pre-incubation time (1 min or less), to equilibrate the formation of immune complexes with the analyte in the sample, thereby reducing the detection limit by an order of magnitude in comparison with the traditional binding of all analytical reagents in the flow. On the example of the system for highly sensitive detection of procalcitonin, the formation of complexes from a few kinds of nanoparticle conjugates is considered and estimated as a tool to enhance the detected optical signal. The possibilities of multiparametric analysis on one test strip are discussed, including the requirements to geometry of applied analytical reagents of different specificities.

The work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 14-14-01131).

УДК 543.9+543.552

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

**Порфирьева А.В., Куликова Т.Н., Степанова В.Б.**

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия, 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, д.18  
e-mail:porfireva-a@inbox.ru*

Рассмотрены условия получения и генерации сигнала электрохимических ДНК-сенсоров на основе полианилина и полифеназинов для высокочувствительного определения антрациклинов – цитостатиков.

**Ключевые слова:** электрохимические сенсоры, ДНК-сенсоры, антрациклиновые противораковые препараты, цитостатики

В докладе рассмотрены новые подходы к созданию ДНК-сенсоров на основе электрополимеризованных материалов с включением нативной ДНК в полимерную пленку или в полиэлектролитные ком-

плексы, получаемые путем самосборки. На примере ДНК-сенсоров на основе полианилина установлена возможность регистрации специфических взаимодействий ДНК по изменению внутренней электрохимической активности полимера либо по изменению тока окисления-восстановления зонда, добавляемого в раствор. Определены условия достижения максимальной чувствительности сигнала на антрациклиновые препараты (доксорубин, даунорубин, идарубин), позволившие определять их субнаномолярные концентрации методами вольтамперометрии и спектроскопии электрохимического импеданса. Проведено сравнение поведения полимерных красителей феназинового ряда в составе аналогичных ДНК-сенсоров и показана возможность разделения вклада окислительного повреждения ДНК и ее интеркалирования цитостатиками.

Исследования проводили при поддержке РФФ (грант 17-73-20024).

UDC 543.9+543.552

## ELECTROCHEMICAL DNA SENSORS FOR THE DETERMINATION OF ANTHRACYCLINE ANTITUMOR MEDICATIONS

Porfireva A.V., Kulikova T.N., Stepanova V.B.

Kazan (Volga-region) federal university, Kazan, Russian Federation, 420008, Kazan, Kremlevskaya Street 18  
e-mail:porfireva-a@inbox.ru

The conditions for the assembling and signal transduction of electrochemical DNA sensors based on polyaniline and polyphenazines have been considered for highly sensitive determination of anthracycline cytostatics.

**Key words:** electrochemical sensors, DNA sensors, anthracycline antitumor medications, cytostatics

In the report, new approaches are considered to the development of the DNA sensors based on electropolymerized materials with native DNA implemented in the polymer films or into the polyelectrolyte complex obtained by self-assembling. The possibility to detect specific DNA interactions has been established on the example of the polyaniline based DNA sensors by monitoring of the changes in the intrinsic electrochemical activity of the polymer and by the shift of the redox current of the probe added to the solution. The conditions of maximal signal sensitivity toward anthracycline medications (doxorubicin, daunorubicin and idarubicin) have been established and their subnanomolar concentrations detected with voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Various polymeric phenazine dyes were compared in the assembly of such DNA sensors and the possibility to distinguish the contribution of the oxidative DNA damage and of its intercalation by cytostatics was shown.

The investigations were supported by Russian Science Foundation (grant No 17-73-20024).

УДК 621.015.1

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОБРАЗЦОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ КЛАСТЕРИЗАЦИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА

Шумянцева В.В., Булко Т.В., Сиголаева Л.В., Кузиков А.В., Погодин П. В., Арчаков А.И.

«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), 119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10, тел. 7 (495) 246-58-20, факс 7 (495) 245-08-57, электронная почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Разработан электроанализ миоглобина с помощью молекулярно импринтированных полимеров в качестве аналогов антител. Проведена 2Д и 3Д- кластеризация образцов плазмы на основе анализа электрохимических параметров.

**Ключевые слова:** биосенсоры, кардиомаркеры молекулярный импринтинг, углеродные нанотрубки, миоглобин, кардиомаркеры

Активное развитие в создании биосенсоров типа "point-of-care" и "detect-to-protect" предполагает конвертацию биохимического события (аффинное связывание, катализ, ингибирование) в аналитический, легко измеряемый сигнал по принципу да/нет для отнесения образца к определенной группе. Матема-

тическая обработка результатов тестов повышает результативность тестирования. При использовании иммуноанализа анализируемый сигнал – это или спектральные характеристики (оптическая плотность, флуоресценция) или окрашивание активной зоны, т.е. одномерное пространство. В электроанализе возможна регистрация нескольких параметров, т.е. использование двух и более параметров (n-мерное пространство), что может повысить точность анализа. Параметры дифференциальной импульсной вольтамперометрии, такие как максимальная амплитуда восстановительного пика (A, nA), площадь пика (S, nA × V), потенциал пика (P, V), были использованы для проведения кластерного анализа плазмы с одним дескриптором ((A, S или P; 1Д кластеризация), двумя дескрипторами (A+S, A+P, или S+P; 2Д-кластеризация), и тремя дескрипторами (A+S+P; 3Д-кластеризация). На основании анализа сбалансированной точности 89% образцов плазмы были определены правильно для 2Д-анализа (A+P или S+P), 75% образцов были определены правильно для 3Д кластеризации (A+S+P).

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

UDC 621.015.1

## THE MULTI-PARAMETER ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF BIOSAMPLES COMBINED WITH COMPUTATIONAL CLUSTER ASSAY

Shumyantseva V.V., Bulko T. V., Sigolaeva L.V., Kuzikov A. V, Pogodin P. V., Archakov A. I.

Electro analysis of myoglobin based on polymeric artificial antibodies and multiwall carbon nanotubes (CNT)/ screen-printed electrode is developed. Subsequent computational clustering based on electrochemical parameters was used for myoglobin assay.

**Key words:** molecular imprinting, carbon nanotubes, electroanalysis, myoglobin, cardiac markers

Surface molecular imprinting technique combined with multi-parameter electrochemical analysis and the subsequent computational clustering was used for electroanalysis of myoglobin. The differential pulse voltammetry (DPV) parameters, such as a maximum amplitude of reduction peak current (A, nA), a reduction peak area (S, nA × V), and a peak potential (P, V), were measured for the sensors after their incubation with non-diluted plasma. The multi-parameter electrochemical analysis of biosamples combined with computational cluster assay was found to provide better accuracy in classification of plasma samples to the groups of HDs or AMI patients. The clustering using only one descriptor (A, S or P; named here as 1D clustering), using simultaneously two descriptors (A+S, A+P, or S+P; named here as 2D-clustering), and finally using simultaneously all three descriptors (A+S+P, named here as 3D-clustering) was analyzed. Based on the values of the balanced accuracy, we can state, that, in general, 89% of samples were located correctly in the case of 2D assay with A+P or S+P descriptors or 3D assay with A+S+P descriptors in comparison to the threshold discrimination that gives only 75% of the balanced accuracy. This approach can be a promising choice for personalized medicine as a new type of “point-of-care” or “detect-to-protect” biosensor.

This research was carried out within the framework of the Program for Basic Research of Russian State Academy of Sciences for 2013-2020.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ И НАУКА О ПИЩЕ. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КОНСТРУИРОВАНИЮ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

## BIOTECHNOLOGY AND SITOLOGY. MODERN APPROACH IN FOOD PRODUCT CONSTRUCTION

1. АМИЛОИДНЫЕ БЕЛКИ РАСТЕНИЙ: ФАКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ, Антонец К.С., Белоусова М.Е., Белоусов М.В., Штарк О.Ю., Косолапова А.О., Нижников А.А., .....	586
AMYLOID PROTEINS IN PLANTS: FACTS AND PERSPECTIVES FOR BIOTECHNOLOGY, Antonets K.S., Belousova M.E., Belousov M.V., Stark O.Yu., Kosolapova A.O., Nizhnikov A.A., .....	587
2. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ВЕГЕТАТИВНОГО МИЦЕЛИЯ И ПЛОДОВЫХ ТЕЛ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ, Н.Р.Альмяшева, А.В.Голышкин, М.И.Шуктуева, Л.М.Краснопольская.....	588
ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ETHANOLIC EXTRACTS OF VEGETATIVE MYCELIUM AND FRUIT BODIES OF XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETES, N.Almyasheva, A.Golyshekin, M.Shuktueva, L.Krasnopolskaya .....	589
3. БИОИНЖЕНЕРИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПОЗИТОВ ИЗ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР, Колпакова В.В., Гайворонская И.С. ....	590
BIOINGENERY OF PROTEIN COMPOSITES FROM CEREAL CROPS, Kolpakova V.V., Gaivoronskaya I.S. ....	591
4. БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ БЕЛКИ МОЛОКА – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ, Ильина А.М., Харитонов Д.В. ....	592
THE BIOLOGICALLY ACIVE MILK PROTEINS – THE PERSPECTIVE COMPONENTS FOR DAIRY PRODUCTS DEVELOPMENT, Ilyina A.M., Kharitonov D.V. ....	593
5. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ЗЕРНОВОЙ БАРДЫ В СУХИЕ КОРМОВЫЕ ДРОЖЖИ, Худякова Н.М., Лозанская Т.И., Римарева Л.В. ....	594
BIOTECHNOLOGICAL PROCESSING OF GRAIN STILLAGE INTO DRY FEED YEAST, Khudyakova N.M., Lozanskaya T.I., Rimareva L.V. ....	595
6. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНВЕРСИИ БИОМАССЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ – ПРОДУКТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПОЛИСАХАРИДОВ И БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НАТУРАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ, Сербя Е.М., Римарева Л.В., Мочалина П.Ю., Оверченко М.Б., Погоржельская Н.С., Антонова А. А. ....	595
BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF CONVERSION OF BIOMASS OF MISCIAL FUNGUS – PRODUCTIVE SOURCES OF POLYSACCHARIDES AND OF PROTEINS FOR THE CREATION OF NATURAL FOOD INGREDIENTS, Serba E. M., Rimareva L. V., Mochalin P. Yu., Overchenko M. B., Pogorzhevska N.S., Antonov A. A. ....	596
7. ВЛИЯНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ГЛЮТЕНА НА ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И ДЕФОРМАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЛОКНИСТЫХ УПАКОВОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ, Захаров И.В., Захарова Н.Л., Канарский А.В, Казаков Я.В. ....	597
THE IMPACT OF BIOCATALYTIC PROCESSING OF GLUTEN ON PHYSICO-MECHANICAL AND DEFORMATION CHARACTERISTICS OF FIBROUS PACKING MATERIALS FOR FOOD PRODUCTS, Zakharov I. V., Zakharova N. L., Kanarskiy A.V., Kazakov Y. V. ....	598
8. ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ И УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА БЕЛКОВЫЙ И СОЛЕВОЙ СОСТАВ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ, Харитонов В.Д., Юрова Е.А., к.т.н., Кобзева Т.В., Мельденберг Д.Н., Семенова Е. С. ....	599
INFLUENCE OF TIME AND STORAGE CONDITIONS ON THE PROTEIN AND SALT COMPOSITION OF DAIRY PRODUCTS, Kharitonov V.D, Yurova E.A, c.t.sc., Kobzeva T.V, Meldenberg D.N, Semenova E.S. ....	600
9. ВЛИЯНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ СОХРАННОСТЬ МАЙОНЕЗА, Рахимова Э.И., Сироткин А.С. ....	601
THE INFLUENCE OF LACTIC ACID BACTERIA ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF MAYONNAISE, Rakhimova E.I., Sirotkin A.S. ....	602
10. ВЛИЯНИЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ИНСТАНТНОЙ КОМПОЗИТНОЙ СМЕСИ НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ЖЕЛУДОЧНОКИШЕЧНОГО ТРАКТА ПРИ КИШЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ, Демидова Т. И., Демидов Д. А, Юдина Т. П. ....	603



THE IMPACT OF SPECIALIZED FOREIGN COMPOSITE MIXTURES ON THE MUCOUS MEMBRANE OF THE GASTROINTESTINAL TRACT AT THE INTESTINAL INSUFFICIENCY, Demidova T. I., Demidov D. A., Yudina T. P. ....	604
11. ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ЛИПИДАМИ, Чеботарёв С. А., Гуреева М. Д., Ганзориг Г., Ульянов Д. С., Хурумова А. А., Зеликина Д. В., Антипова А. С., Мартиросова Е. И., Медведева И. Б., Семёнова М. Г. ....	605
IMPACT OF CHITOSAN ON THE STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE COMPLEXES OF WHEY PROTEIN ISOLATE WITH BIOLOGICALLY ACTIVE LIPIDS, Chebotarev S. A., Gureeva M. D. I., Ganzorig G., Ulyanov D.S., Hurumova A.A., Zelikina D. V., Antipova A. S., Martirosova E. I., Medvedeva I. B., Semenova M.G. ....	606
12. ГМ КАРТОФЕЛЬ ЛИНИИ EH92-527-1: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ, Садыкова Э.О., Тышко Н. В., Сухачева М.В., Батурин А.К. ....	607
GM POTATO LINE EH92-527-1: THE IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION, Sadykova E.O., Tyshko N. V., Suhacheva M.V., Baturin A.K. ....	608
13. ЗАЩИТНЫЕ СПОСОБНОСТИ ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА ПО ОТНОШЕНИЮ К ИНКАПСУЛИРОВАННОЙ ИМ ЭКВИМАССОВОЙ КОМБИНАЦИИ НЕЗАМЕНИМЫХ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 ЖИРНЫХ КИСЛОТ, Ульянов Д. С., Хурумова А.А., Ганзориг Г., Чеботарёв С.Д., Гуреева М. Д., Зеликина Д. В., Антипова А.С., Мартиросова Е. И., Медведева И. Б., Семёнова М.Г. ....	608
PROTECTIVE ABILITY OF WEY PROTEIN ISOLATE RELATIVE TO THE ENCAPSULATED BY IT EQUIMASS COMBINATIONS OF OMEGA-3 AND OMEGA-6 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, Ulyanov D.S., Hurumova A.A., Ganzorig G., Chebotarev S. A., Gureeva M. D., Zelikina D. V., Antipova A. S., Martirosova E. I., Medvedeva I. B., Semenova M. G. ....	609
14. ИЗУЧЕНИЕ БИОКОНВЕРСИИ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ И ЖИВОТНОЙ ПРИРОДЫ, А.Г.Ахремко ....	609
PROTEOLYTIC PLANT AND ANIMAL ORIGIN ENZYMES INFLUENCE ON MUSCLE PROTEINS BIOCONVERSION, A.Akhremko ....	611
15. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ LACTOCOCCUS LACTIS K-205 ДЛЯ ПРОДЛЕНИЯ СРОКА ХРАНЕНИЯ ОХЛАЖДЕННОГО МЯСА, Сульtimiова Т. Д., Стоянова Л. Г. ....	612
INVESTIGATION OF THE STRAIN LACTOCOCCUS LACTIS K-205 FOR EXTENSION OF THE LIMITED STORE OF COOLED MEAT, T.D. Sultimova, L.G. Stoyanova ....	613
16. ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭЛИСИТОРА МЕТИЛЖАСМОНАТА НА РОСТОВЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ PANAX GINSENG С.А. MEYER, Филимонова В.В., Константинова Н.А., Фоменко И.А., Раздина И.И. ....	614
ELICITOR METHYL JASMONATE INFLUENCE ON GROWTH AND BIOSYNTHETIC CHARACTERISTICS OF SUSPENSION CULTURE PANAX GINSENG С.А. MEYER, Filimonova V.V., Konstantinova N.A., Fomenko I.A., Razdina I.I. ....	615
17. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ БЕТА-АГОНИСТОВ В МЯСНЫХ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ, Зверева Е.А., Шпакова Н.А., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. ....	616
IMMUNOCHEMICAL METHODS OF RAPID DETECTION OF BETA-AGONISTS IN MEAT AND DAIRY PRODUCTS, Zvereva E.A., Shpakova N.A., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	616
18. ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В КОНТРОЛЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРОИЗВОДСТВА АЛКОГОЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ, Шелехова Н.В., Поляков В.А., Серба Е.М., Шелехова Т.М., Веселовская О.В., Скворцова Л.И. ....	617
INSTRUMENTAL METHODS IN THE CONTROL OF TECHNOLOGICAL PROCESSES OF PRODUCTION OF ALCOHOLIC BEVERAGES, Shelekhova N. V., Serba E.M., Polyakov V. A., Shelekhova T. M., Veselovskaya O. V., Skvortsova L. I. ....	618
19. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В ОВОЩЕВОДСТВЕ ЗАКРЫТОГО ГРУНТА, Павловская Н.Е., Бородин Д.Б., Гагарина, И.Н., Яковлева И.В. ....	619
THE USE OF BIOLOGICAL PESTICIDES IN VEGETABLE-GROWING GREENHOUSE, Pavlovskaya N. E. Borodin D. B., Gagarina I. A. Yakovlev I. V. ....	620
20. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЛИЗАТОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ КОРОВЬЕГО МОЛОКА ПРИ РАЗРАБОТКЕ ТВОРОЖНОГО МУССА ОБОГАЩЕННОГО АПФ-ИНГИБИРУЮЩИМИ ПЕПТИДАМИ, А.Г. Кручинин ....	621

USAGE OF COW'S MILK WHEY PROTEIN HYDROLYSATES FOR DEVELOPMENT OF QUARK MOUSSE ENRICHED BY ACE - INHIBITING PEPTIDES, A.Kruchinin.....	622
21. ИССЛЕДОВАНИЕ ДОВИЗУАЛЬНОЙ ЗАРАЖЕННОСТИ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ РАСТЕНИЙ, Гагарина И.Н., Павловская Н.Е., Гаврилова А.Ю., Солохина И.Ю.....	623
INVESTIGATION OF THE DIVISUAL INFLUENCE OF VEGETABLE CROPS WITH THE USE OF PROTEIN COMPOUNDS OF PLANTS, Gagarina I.N., Pavlovskaya N.E., GavriloVA A.Yu., Solokhina I.Yu.....	624
22. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА НА ТЕСТ-ШТАММЫ S.AUREUS, Ильина А.М.,.....	624
INVESTIGATION OF INHIBITORY EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE MILK PROTEINS ON S-AUREUS TEST – STRAINS, Ilyina A.M.....	625
23. КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РОСТА СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ И БАЦИЛЛ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРЕБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ, Евдокимова С.А., Мищенко А.С., Грошева В.Д., Кареткин Б.А., Гусева Е.В., Панфилов В.И. ....	626
KINETIC MODEL OF MIXED CULTURE GROWTH OF BIFIDOBACTERIA AND BACILLI FOR ASSESSMENT PREBIOTIC ACTIVITY, Evdokimova S. A., Mishchenko A. S., Grosheva V.D., Karetkin B.A., Guseva E. V., Panfilov V.I.....	627
24. К ВОПРОСУ РЕГУЛИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ЖИВОГО ОРГАНИЗМА С ПОМОЩЬЮ МИНОРНЫХ САХАРОВ, Анохина Е. П., Исyва М. М., Корнеева О. С. ....	628
TO THE PROBLEM OF REGULATION OF THE REPRODUCTIVE FUNCTION OF LIVING ORGANISM WITH THE HELP OF MINOR SUGAR, Anokhina E. P, Isuva M. M, Korneeva O. S.....	629
25. МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ИМУННО-ХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КОАГУЛИРОВАННОГО ЯИЧНОГО БЕЛКА, Стефанова И.Л., Мазо В.К., Зорин С.Н., Мокшанцева И.В., Клименкова А.Ю. ....	630
BIOMEDICAL AND IMMUNOCHEMICAL EVALUATION OF THE COAGULATED EGG ALBUMEN, Stefanova I.L., Mazo V.K., Zorin S.N., Mokshantseva I.V., Klimentkova A.Yu.....	631
26. МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РАЗРАБОТАННОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ПРОБИОТИЧЕСКИМ МИКРООРГАНИЗМОМ L. REUTERI LR, Т.А.Раскошная, А.В.Бегунова.....	631
THE MEDICAL-BIOLOGICAL EVALUATION OF THE DEVELOPED FERMENTED DAIRY PRODUCT WITH PROBIOTIC MICROORGANISM L.REUTERI LR, T.Raskoshnaya, A.Begunova.....	632
27. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН КОМПОЗИЦИОННЫХ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПИЩЕВЫХ БИОПОЛИМЕРОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ: ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И ВОЗМОЖНОСТИ, Зеликина Д. В., Антипова А.С., Семёнова М.Г. ....	633
MOLECULAR DESIGN OF THE COMPOSITE MULTIFUNCTIONAL INGREDIENTS BASED ON FOOD BIOPOLYMERS AND BIOACTIVE COMPOUNDS: THE GENERAL APPROACHES AND PERSPECTIVES, Zelikina D.V., Antipova A.S., Semenova M.G.....	634
28. ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ ДРОЖЖЕЙ РОДА RHODOTORULA, Червякова О.П., Симагина П.В., Макарова М.И., Суясов Н.А. ....	634
OXIDATIVE STRESS AS A METHOD OF INCREASING THE BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS BY YEASTS OF THE GENUS RHODOTORULA, Chervyakova O.P., Simagina P.V., Makarova M. I., Suyasov N.A.....	635
29. НОВЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ АЭРИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ, Агарков А.А., Харитонов Д.В., Харитонов В.Д. ....	636
NEW APPROACH TO THE CREATION OF AERATED MILK PRODUCTS ON THE BASIS OF THE SECONDARY MILK RAW MATERIALS, Agarkov A.A.,Kharitonov D.V., Kharitonov. V.D.....	637
30. ОСНОВЫ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА АЛЛЕРГЕННЫХ БЕЛКОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, Борщева Ю.А., Курбатова Е.И., Соколова Е.Н., Фурсова Н.А., Римарева Л.В., Дыдыкин А.С.....	638
FUNDAMENTALS OF BIOCATALYTIC EFFECT ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF ALLERGENIC PROTEINS IN FOODS OF ANIMAL AND PLANT ORIGIN, Borshcheva Yu.A., Kurbatova E.I., Sokolova E.N., Fursova N.A., Rimareva L.V., Dydykin A.S.....	639
31. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ РЕЦЕПТУР НОВЫХ ВИДОВ ВОДОК С ЦЕЛЬЮ СНИЖЕНИЯ ИХ ТОКСИЧНОСТИ, Абрамова И.М., Головачёва Н.Е., Поляков В.А., Морозова С.С., Калинина А.Г. ....	640
TO ASSESS THE POSSIBILITY OF APPLICATION OF COMPLEX FOOD ADDITIVES WHEN DESIGNING	

FORMULATIONS FOR NEW TYPES OF VODKAS TO REDUCE THEIR TOXICITY, Abramova I.M., Golovacheva N.E., Polyakov V.A., Morozova S.S., Kalinina A.G. ....	642
32. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАССЫ ЛИЧИНОК МУХИ ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА HERMETIA ILLUCENS В КОРМОВЫХ(ПИЩЕВЫХ) ЦЕЛЯХ, Ушакова Н.А., Бастратов А.И.....	643
PROSPECTS FOR USING THE BIOMASS OF THE LARVAE OF THE BLACK SOLDIER FLY HERMETIA ILLUCENS FOR FODDER (FOOD) PURPOSES, Ushakova N.A., Bastrakov A.I. ....	644
33. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ МОЛОКА, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ, Гарбуз С.А., Забодалова Л.А.....	645
OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE MILK PEPTIDES WITH IMMUNITY-EMULATORY PROPERTIES, Garbuz S.A., Zabadalova L.A. ....	646
34. ПОЛУЧЕНИЕ НАПИТКОВ НА МОЛОЧНО-ЗЛАКОВОЙ ОСНОВЕ, Крючкова К.В., Забодалова Л.А.....	647
OBTAINING BEVERAGES ON THE DAIRY-CEREAL FRAMEWORK, Kryuchkova, K.V., Zabadalova L.A. ....	648
35. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БИОДЕГРАДАБЕЛЬНОГО ПИЩЕВОГО ПЛЕНОЧНОГО ПОКРЫТИЯ, А.Д.Горневская, К.Е.Белоглазова, А.А.Ульянин, В.И.Палагин, Г.Е.Рысмухамбетова, Л.В.Карпунина .....	648
PRACTICAL APPLICATION OF A BIODEGRADABLE FOOD FILM COATING, A.Gornevskaya, C.Beloglazova, A.Ulyanin, V.Palagin, G.Rysmukhambetova, L.Karpunina.....	649
36. ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ БИОМАССЫ МИКРОМИЦЕТА MORTIERELLARETICULATA КАК СТАБИЛИЗАТОР СМЕСЕЙ ДЛЯ ВНУТРИКИШЕЧНОГО ЗОНДОВОГО ПИТАНИЯ, Демидова Т.И., Юшина Е.А., Богуш В.И. ....	650
PREPARATIONS BASED ON BIOMASS OF MIKROMITSETY MORTIERELLARETICULATA AS A STABILIZER OF BLENDS FOR PROBE NUTRITION, Demidova T.I., Yushina E.A., Bogush V.I. ....	651
37. ПРИМЕНЕНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА β-ГЛЮКАНА, Гематдинова В. М., Канарская З.А., Канарский А.В. ....	652
APPLICATION OF BIOCATALYTIC METHODS IN THE TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF β-GLUCANE, Gematdinova V.M., Kanarskaya Z.A., Kanarskiy A.V., ....	653
38. ПРИМЕНЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ГАЛАКТООЛИГОСАХАРИДОВ, Рябцева С. А., Храмцов А.Г., Лодыгин А.Д., Котова А. А., Скрипнюк А.А., Родная А.Б. ....	654
APPLICATION OF YEAST AND LACTIC ACID BACTERIA FOR Galactooligosaccharides BIOSYNTHESIS, Ryabtseva S.A., Khramtsov A.G., Lodygin A.D., Kotova A.A., Skripnyuk A.A., Rodnaya A.B.....	655
39. ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ, В.И.Белявская, Э.К.Мухамеджанов .....	655
FOOD PRODUCTS FOR HEALTH, V.Belyavskaya, E.Mukhamejanov .....	656
40. РАДИОПРОТЕКТОРНЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ГЕЛЯ ИЗ БУРЫХ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ, Одинец А.Г.....	657
RADIOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE GEL FROM BROWN ALGAE, Odinec A.G.....	659
41. РАЗРАБОТКА ЙОГУРТОВ, ОБОГАЩЕННЫХ ПИЩЕВЫМИ ВОЛОКНАМИ, Т.В.Тимофеева, Ю.В.Ушакова, Г.Е.Рысмухамбетова, М.В.Белова, .....	660
DEVELOPMENT OF YOGHURTS ENRICHED WITH FOOD FIBERS, V.Timofeeva, Y.Ushakova, G. Rysmukhambetova, M.Belova .....	661
42. РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ДЛЯ СЫРОДЕЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ НА ОСНОВЕ ПРОХИМОЗИНА VICUGNA PACOS, С.В.Беленькая, В.В.Ельчанинов, А.П.Рудометов, Д.Н.Щербakov .....	662
DEVELOPMENT OF THE MILK COAGULATING FERMENT PRODUCER FOR THE CHEESE-MAKING INDUSTRY BASED ON PROCHIMOSIN VICUGNA PACOS, S.Belenkaya, V.Elchaninov, A.Rudometov, D.Shcherbakov.....	663
43. РАЗРАБОТКА СРЕДСТВА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР ОТ КОМПЛЕКСА ПАТОГЕНОВ НА ОСНОВЕ БАВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Солохина И.Ю., Лушников А.В. ....	664
THE DEVELOPMENT TOOLS FOR THE PROTECTION OF VEGETABLE CROPS FROM A COMPLEX OF PATHOGENS ON THE BASIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF NATURAL ORIGIN, Gneusheva I. A., Pavlovskaya N. E. Solokhina I. Yu., Lushnikov A. V.....	665

44. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ И ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ ЗЕРНОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ, Хромова Н. Ю., Сальникова А. Г., Кареткин Б. А., Гордиенко М. Г., Шакир И. В., Панфилов В. И. ....	666
DEVELOPMENT OF BASIC TECHNOLOGIES FOR PROBIOTIC FUNCTIONAL PRODUCTS AND INGREDIENTS BASED ON CEREAL HYDROLYSATES, Khromova N. Yu., Sal'nikova A. G., Karetkin B. A., Gordienko M. G., Shakir I. V., Panfilov V. I. ....	667
45. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ, С.Ю.Макарова, Г.Е.Рысмухамбетова, И.В.Ишмурзин, Н.А.Еремеева, Д.И.Галяутдинов .....	668
DEVELOPMENT OF A TECHNOLOGY OF POLYSACCHARIDE-BASED FUNCTIONAL PRODUCTS, S.Makarova, G.Rysmukhambetova, I.Ishmurzin, N.Yeremeyeva, D.Galyautdinov .....	669
46. СКРИНИНГ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПОЛИКОМПОНЕНТНОГО КОНСОРЦИУМА, Волкова Г.С., Куксова Е.В., Фурсова Н.А., Кривова А. Ю., Римарева Л.В. ....	670
SCREENING OF HIGHLY PRODUCTIVE STRAINS OF LACTIC BACTERIA FOR CREATION OF MULTICOMPONENT CONSORTIUM, Volkova G.S., Kuksova E.V., Fursova N.A., Krivova A. Yu., Rimareva L.V. ....	671
47. СТАБИЛИЗАЦИЯ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ЖИДКИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ, Чижаяева А.В., Дудикова Г.Н., Амангельды А.А., Бутыркина Н.П. ....	672
STABILIZATION OF ANTAGONISTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA IN FLUID MICROBIOLOGICAL PREPARATIONS, Chizhayeva A.V., Dudikova G.N., Amangeldi A.A., Butyrkina N.P. ....	673
48. СТРУКТУРНЫЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ИЗОЛЯТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛИПИДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ IN VITRO, Хурумова А. А., Ганзориг Г., Гуреева М. Д., Ульянов Д. С., Чеботарёв С. Д., Зеликина Д. В., Антипова А. С., Мартиросова Е. И., Медведева И. Б., Семёнова М. Г. ....	674
STRUCTURAL AND THERMODYNAMIC PARAMETERS UNDERLYING THE RELEASE OF THE ENCAPSULATED BY WEY PROTEIN ISOLATE BIOLOGICALLY ACTIVE LIPIDS IN THE GASTRO-INTESTINAL TRACT IN VITRO, Hurumova A.A., Ganzorig G., Gureeva M. D., Ulyanov D.S., Chebotarev S. A., Zelikina D. V., Antipova A. S., Martirosova E. I., Medvedeva I. B., Semenova M. G. ....	674
49. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ИНСТАНТНЫХ КОМПЗИТНЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ЭНТЕРОСОБЦИИ И НУТРИТИВНОЙ ПОДДЕРЖКИ, Демидова Т. И., Юдина Т.П., Андрейко В. С. ....	675
THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS OF DESIGNING SPECIALIZED INSTANTONS COMPOSITE MIXTURES FOR ENTEROCOSI AND NUTRITIONAL SUPPORT, Demidova T. I., Yudina T. P., Andreiko V. S. ....	676
50. ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО КРАХМАЛСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ НА ЭТИЛАЦЕТАТ И КОРМОПРОДУКТЫ, Туршатов М.В., Соловьев А.О., Кононенко В.В., Леденев В.П., Кривченко В.А., Моисеева Н.Д., Кириллов Е.А. ....	677
TECHNOLOGY OF PLANT STARCH-CONTAINING RAW MATERIAL PROCESSING FOR ETHYL ACETATE AND FODDERS, Turshatov M.V., Solovyov A.O., Kononenko V.V., Ledenev V.P. Krivchenko V.A., Moiseeva N.D., Kirillov E.A. ....	678
51. ФАЗНОЕ ПИТАНИЕ – НОВЫЙ ПРИНЦИП ПИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА, Мухамеджанов Э.К., Ерджанова С.С., Белявская Д.И. ....	679
PHASE NUTRITION – NEW MODEL NUYRITION OF HUMANS, Mukhamejanov E.K., Erjanova S.S., Belyavskaya D.I. ....	680
52. ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АТАКУЕМОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ КРАХМАЛА В КЛЕЙСТЕРИЗОВАННОМ СОСТОЯНИИ, Папахин А.А., Бородина З.М. ....	680
ENZYMATIC SENSITIVITY OF DIFFERENT TYPES OF STARCH IN THE GELATINIZED STATE, Papakhin A.A., Borodina Z.M. ....	681
53. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ ОСНОВНЫХ АНТИПИТАТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ СОИ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК, Костылева Е.В., Середина А.С., Великоретская И.А., Шариков А.Ю., Цурикова Н.В., Скороход В.В. ....	682
ENZYME PREPARATIONS PROVIDING DESTRUCTION OF THE MAIN SOYBEAN ANTI-NUTRITIONAL FACTORS FOR OBTAINING PROTEIN FEED ADDITIVES, Kostyleva E.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Sharikov A.Yu., Tsurikova N.V., Skorokhod V.V. ....	683

54. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ КУРИНОГО ЯЙЦА, Стефанова И.Л., Мазо В.К., Кавтарашвили А.Ш., Клименкова А.Ю., Шахназарова Л.В. ....	684
FUNCTIONAL EgG BASED FOODSTUFFS, Stefanova I.L., Mazo V.K., Kavtarashvili A. Sh., Klimenkova A.Yu., Shahnazarova L.V. ....	685
55. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ НА ОСНОВЕ КУРИНОГО ЯИЧНОГО БЕЛКА ИЛИ МЕЛАНЖА ОБОГАЩЕННЫЙ ЙОДОМ, Стефанова И.Л., Мокшанцева И.В., Шахназарова Л.В., Клименкова А.Ю., Мазо В.К. ....	686
FUNCTIONAL IODINE-ENRICHED FOODSTUFFS BASED ON THE ALBUMEN OR MELANGE OF CHICKEN EGGS, Stefanova I.L., Mokshantseva I.V., Shahnazarova L.V., Klimentkova A.Yu., Mazo V.K. ....	686
56. ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ОБОГАЩЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ЯИЦ ПНЖК $\Omega$ -3, СЕЛЕНОМ И ВИТАМИНОМ Е, Кавтарашвили А.Ш., Стефанова И.Л., Свиткин В.С., Новоторов Е.Н. ....	688
THE EFFICIENCY OF BIOFORTIFICATION OF TABLE EGGS WITH $\Omega$ -3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, SELENIUM, AND VITAMIN E, Kavtarashvili A.Sh., Stefanova I.L., Svitkin V.S., Novotorov E.N. ....	689
57. ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ИНГРЕДИЕНТОВ ДЛЯ ЗДОРОВЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ, Кудряшов В.Л., Погоржельская Н.С., Фурсова Н. А., Алексеев В.В. ....	690
EFFICIENCY OF MEMBRANE PROCESSES IN THE PRODUCTION OF INGREDIENTS FOR HEALTHY FOODSTUFFS, Kudryashov V.L., Pogorzelskaya N.S., Fursova N.A., Alekseev V.V. ....	691
58. ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ TRICHODERMA REESEI С УВЕЛИЧЕННОЙ КСИЛАНАЗНОЙ И ЭНДОГЛЮКАНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ОСАХАРИВАНИИ РЖАНОГО СУСЛА, Костылева Е.В., Цурикова Н.В., Середя А.С., Великорецкая И.А., Айсина А.М., Михайличенко Е.А. ....	692
EFFICIENCY OF A NEW TRICHODERMA REESEI ENZYME PREPARATION WITH INCREASED XYLANASE AND ENDOGLUCANASE ACTIVITY IN THE PROCESS OF RYE WORT SACCHARIFICATION, Kostyleva E.V., Tsurikova N.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Aisina A.M., Mihaylichenko E.A. ....	693
59. ЭФФЕКТИВНЫЙ КОНТРОЛЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА СПИРТА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ, Медриш М.Э., Абрамова И.М., Поляков В.А., Павленко С.В. ....	694
EFFECTIVE CONTROL OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESS OF ALCOHOL PRODUCTION USING HPLC METHOD, Medrish M.E., Abramova I.M., Polyakov V.A., Pavlenko S.V. ....	695

## АМИЛОИДНЫЕ БЕЛКИ РАСТЕНИЙ: ФАКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Антонец К.С.<sup>1,2</sup>, Белоусова М.Е.<sup>1</sup>, Белоусов М.В.<sup>1,2</sup>, Штарк О.Ю.<sup>1</sup>, Косолапова А.О.<sup>1,2</sup>, Нижников А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Подбельского ш., 3, Пушкин, Санкт-Петербург, 196608, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

e-mail: kirantonez@gmail.com

Амилоиды – белковые фибриллы с уникальной структурой. Эти фибриллы являются не только летальными патогенами, но и важным функциональным вариантом четвертичной структуры белка. До недавнего времени амилоидные белки растений выявлены не были, однако полученные нами данные показывают, что амилоидными свойствами обладают некоторые запасные белки семян.

**Ключевые слова:** амилоид, фибрилла, запасной белок семян, растение

Амилоиды представляют собой белковые фибриллы, обладающие уникальной физической и химической стабильностью за счет образования межмолекулярных бета-слоев, стабилизированных многочисленными водородными связями. Амилоиды изначально были известны как патогены, однако в последние годы функциональные амилоиды, выполняющие жизненно-важные функции, были обнаружены во всех трех доменах живого мира. Важнейшей группой многоклеточных организмов, у которых до сих пор не были найдены амилоиды, являются растения [1].

Мы провели поиск кандидатов на роль функциональных амилоидов в протеомах 75 видов растений, депонированных в базе данных Uniprot (uniprot.org). Для этого мы использовали программу Waltz [2], кото-

рая предсказывает короткие амилоидогенные участки, и алгоритм SARP [3], который ищет протяженные участки, обогащенные аминокислотами с высоким амилоидогенным потенциалом, такими как глутамин и аспарагин (QN-богатые участки). Доля белков, содержащих амилоидогенные участки, предсказанные обеими программами, в протеомах растений сильно варьировала даже в пределах одного рода. Мы показали, что трансмембранные транспортные белки обогащены амилоидогенными участками, предсказанными Waltz. Группа белков, содержащих QN-богатые участки, обладала более разнообразными функциями, включая, например, регуляторные, защитные белки и транскрипционные факторы. Среди QN-богатых амилоидогенных белков, выявленных у большинства видов растений, были запасные белки семян [4]. Мы провели экспериментальный анализ амилоидных свойств некоторых запасных белков и показали, что они действительно формируют фибриллы, обладающие ключевыми особенностями амилоидов.

Принимая во внимания, что недавно была показана устойчивость некоторых запасных белков растений к перевариванию [5], изучение амилоидных свойств запасных белков семян, а также возможности блокировать образование этими белками амилоидов, может иметь высокую экономическую значимость в контексте создания новых сортов растений с улучшенными питательными свойствами.

Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 17-16-01100.

#### Литература:

1. Antonets K.S. and Nizhnikov A.A. Amyloids and prions in plants: Facts and perspectives. // *Prion*. 2017. Vol. 11(5). P. 300-312.
2. Maurer-Stroh S. et al. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. // *Nat. Methods*. 2010. Vol. 7. P. 237-242.
3. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. SARP: a novel algorithm to assess compositional biases in protein sequences. // *Evol. Bioinform*. 2013. Vol. 9. P. 263-73.
4. Antonets K.S. and Nizhnikov A.A. Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants. // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. Vol. 18(10). E2155.
5. Ribeiro I.C. et al. Identification of chickpea seed proteins resistant to simulated in vitro human digestion. // *J. Proteomics*. 2017. Vol. 169. P. 143-152.

## AMYLOID PROTEINS IN PLANTS: FACTS AND PERSPECTIVES FOR BIOTECHNOLOGY

Antonets K.S.<sup>1,2</sup>, Belousova M.E.<sup>1</sup>, Belousov M.V.<sup>1,2</sup>, Stark O.Yu.<sup>1</sup>, Kosolapova AO.<sup>1,2</sup>, Nizhnikov AA.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>. All-Russia Research Institute of Agricultural Microbiology, Podbelskogo sh., 3, Pushkin, St. Petersburg, 196608, Russia

<sup>2</sup>. St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia  
e-mail: kirantonez@gmail.com

Amyloids are protein fibrils with a unique structure. These fibrils represent not only lethal pathogens, but also an important functional variant of the quaternary structure of the protein. Until recently, amyloid proteins were not identified in plants, but our data show that some seed storage proteins have amyloid properties.

**Key words:** amyloid, fibril, seed storage protein, plant

Amyloids are protein fibrils which possess unique physical and chemical stability due to the formation of intermolecular beta sheets stabilized by numerous hydrogen bonds. Amyloids were originally known as pathogens, but, in recent years, functional amyloids that perform vital functions have been found in all three domains of the living world. The most important group of multicellular organisms in which amyloids have not yet been found are plants [1].

We searched for candidates for functional amyloids in the proteomes of 75 species of plants deposited in the Uniprot database (uniprot.org). For this, we used Waltz program [2], which predicts short amyloidogenic regions, and SARP algorithm [3], which searches for extended regions enriched with amino acids with high amyloidogenic potential, such as glutamine and asparagine (QN-rich regions). We found that fraction of proteins containing amyloidogenic regions predicted by both programs in the plant proteomes varied greatly even within the same genus. We showed that the transmembrane transport proteins are enriched with amyloidogenic regions predicted with Waltz. The group of proteins containing QN-rich regions possessed more diverse functions including regulatory and defense proteins, transcription factors. Notably, seed storage proteins were detected among QN-rich

amyloidogenic proteins in most plant species [4]. We performed an experimental analysis of the amyloid properties of some seed storage proteins and showed that they indeed form fibrils exhibiting key features of amyloids.

Considering that some seed storage proteins has recently been shown to be resistant to digestion [5], the study of the amyloid properties of seed storage proteins as well as the possibility to block the formation of amyloids by these proteins could have high economic significance in the context of creating new varieties of plants with improved nutritional properties.

This study was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 17-16-01100.

References:

1. Antonets K.S. and Nizhnikov A.A. Amyloids and prions in plants: Facts and perspectives. // *Prion*. 2017. Vol. 11(5). P. 300-312.
2. Maurer-Stroh S. et al. Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. // *Nat. Methods*. 2010. Vol. 7. P. 237-242.
3. Antonets K.S., Nizhnikov A.A. SARP: a novel algorithm to assess compositional biases in protein sequences. // *Evol. Bioinform*. 2013. Vol. 9. P. 263-73.
4. Antonets K.S. and Nizhnikov A.A. Predicting amyloidogenic proteins in the proteomes of plants. // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. Vol. 18(10). E2155.
5. Ribeiro I.C. et al. Identification of chickpea seed proteins resistant to simulated in vitro human digestion. // *J. Proteomics*. 2017. Vol. 169. P. 143-152.

УДК: 579.61, ББК: 30.16

## АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ВЕГЕТАТИВНОГО МИЦЕЛИЯ И ПЛОДОВЫХ ТЕЛ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Н.Р.Альмяшева, А.В.Гольшкин, М.И.Шуктуева, Л.М.Краснопольская

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021, Москва, Большая Пироговская, 11, [almyashevanya@mail.ru](mailto:almyashevanya@mail.ru), +79057988058

Проведено исследование антирадикальной активности, хелатирующей способности и ингибирующего действия на процесс перекисного окисления липидов этанольных экстрактов ксилотрофных базидиальных грибов. Выявлены различия в антиоксидантных свойствах экстрактов вегетативного мицелия и плодовых тел базидиомицетов.

**Ключевые слова:** антиоксиданты, базидиальные грибы, вегетативный мицелий, плодовые тела

Важным направлением современной биофармацевтики является поиск новых антиоксидантов природного происхождения. Ксилотрофные базидиальные грибы продуцируют широкий спектр биологически активных соединений, в том числе полисахариды и низкомолекулярные соединения, обладающие антиоксидантными свойствами [1, 2]. Биологически активные метаболиты содержатся в плодовых телах и вегетативном мицелии базидиомицетов [3].

Цель настоящей работы состояла в оценке антиоксидантных свойств низкомолекулярных соединений, выделенных из вегетативного мицелия и плодовых тел ксилотрофных базидиальных грибов.

Антирадикальная активность, хелатирующая способность по отношению к Fe<sup>2+</sup> и ингибирующее действие на процесс перекисного окисления липидов обнаружены у этанольных экстрактов базидиомицетов, относящихся к видам *Ganodermalucidum* (Curtis) P. Karst, *Grifolafrondosa* (Dicks.) Gray, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer.

Показано, что химический состав лигноцеллюлозного сырья, используемого для получения плодовых тел ксилотрофных базидиомицетов, оказывает влияние на содержание в них низкомолекулярных антиоксидантов и полисахаридов. Предложен субстрат на основе хвойных опилок, обеспечивающий получение плодовых тел с повышенным содержанием антиоксидантов фенольной природы. Для получения вегетативного мицелия базидиомицетов были модифицированы ранее разработанные способы погруженного культивирования [4, 5].

В ходе исследования были выявлены различия в антиоксидантных свойствах экстрактов вегетативного мицелия и базидиомицетов штаммов *H. erinaceus* и *A. aegerita*. Экстракт плодовых тел *H. erinaceus* обладал более высокой антирадикальной активностью по сравнению с экстрактами мицелия и полностью инги-

бирова́л процесс перекисного окисления липидов. Низкомолекулярные соединения, входящие в состав экстракта вегетативного мицелия, проявили способность к деструкции гидропероксидов.

#### Литература:

1. Heleno S.A., Barros L., Martins A., Queiroz M.J.R., Morales P., Fernández-Ruiz V., Ferreira I.C. Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species // *LWT-Food Science and Technology*, 2015. – Vol. 63. – №. 1. – P. 475-481. 2. Альмяшева Н. Р., Ярина М. С., Голышкин А. В., Джавахян Б. Р., Краснополяская Л. М. Антиоксидантные свойства водорастворимых полисахаридов и этанольных экстрактов мицелия ксилотрофных базидиальных грибов // *Антибиотики и химиотерапия*, 2017. – Т. 62. – №. 7-8. 3. Greeshma P., Ravikumar K.S., Neethu M.N., Pandey M., Zuhara K.F., Janardhanan K.K. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of cultured mycelia and fruiting bodies of the elm oyster mushroom, *Hypsizygus ulmarius* (Agaricomycetes) // *International journal of medicinal mushrooms*, 2016. – Vol. 18. – №3. 4. Автономова А.В., Леонтьева М.И., Исакова Е.Б., Белицкий И.В., Усов А.И., Бухман В.М., Лапин А.А., Краснополяская Л.М. Противоопухолевые и антиоксидантные свойства полисахаридных экстрактов и фракций биомассы базидиомицета *Hypsizygus ulmarius*, полученной путем глубинного культивирования. // *Биотехнология*, 2008. - № 2. – С. 23-29 5. Краснополяская Л.М., Шуктуева М.И., Автономова А.В., Ярина М.С., Джавахян Б.Р., Исакова Е.Б., Бухман В.М. Противоопухолевые и антиоксидантные свойства водорастворимых полисахаридов из мицелия базидиального гриба *Flammulina velutipes* // *Антибиотики и химиотерапия*, 2016. – Т. 61. - № 11-12. – С. 16-20.

UDC 579.61, BBC 30.16

## ANTIOXIDANT PROPERTIES OF ETHANOLIC EXTRACTS OF VEGETATIVE MYCELIUM AND FRUIT BODIES OF XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETES

N.Almyasheva, A.Golyshkin, M.Shuktueva, L.Krasnopolskaya

Gause Institut of New Antibiotics, Russia, 119021, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya, 11

Radical-scavenging activity assay, ferrous ions chelating assay and oleic acid peroxidation assay were applied to investigate antioxidant properties of ethanolic extracts of xylotrophic basidiomycetes. Differences in antioxidant properties of extracts of vegetative mycelium and fruit bodies were observed.

**Key words:** antioxidants, basidiomycetes, vegetative mycelium, fruit bodies

In the field of biopharmaceuticals, the search for new natural antioxidants is an important research direction. Xylotrophic basidiomycetes produce a wide range of biologically active compounds including polysaccharides and low molecular weight compounds with antioxidant properties [1, 2]. Biologically active metabolites are contained in fruit bodies and the vegetative mycelium of basidiomycetes [3].

The aim of the present work is to study the antioxidant properties of low-molecular compounds from the vegetative mycelium and fruiting bodies of xylotrophic basidiomycetes.

Free radical-scavenging activity, iron-chelating activity and protective action against lipid peroxidation of basidiomycete extracts of the species *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray, *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer, *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers., *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm., *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer were found.

The chemical composition of lignocellulosic raw materials used to produce fruit bodies of xylotrophic basidiomycetes was shown to influence the low-molecular antioxidants and polysaccharides content. A substrate with coniferous sawdust, which ensures the production of fruit bodies with a high content of phenolic antioxidants, was proposed. To produce the vegetative mycelium of basidiomycetes, previously developed methods of submerged cultivation were modified [4, 5].

In the present study, differences in antioxidant properties of extracts of vegetative mycelium and fruit bodies of *H. erinaceus* and *A. aegerita* strains were observed. Extract of fruit bodies of *H. erinaceus* showed higher free radical-scavenging activity than the activity of vegetative mycelium extract and completely inhibited the lipid peroxidation. Low-molecular compounds from the vegetative mycelium could decompose hydroperoxides.

#### References:

1. Heleno S.A., Barros L., Martins A., Queiroz M.J.R., Morales P., Fernández-Ruiz V., Ferreira I.C. Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species // *LWT-Food Science and Technology*, 2015. – Vol. 63. – №. 1. – P. 475-481. 2. Almyasheva N.R., Yarina M.S., Golyshkin A.V., Dzhevakhyan B.R., Krasnopolskaya L.M. Antioxidant properties of water-soluble polysaccharides and ethanolic



extracts of xylotrophic basidiomycetes mycelium // *Antibiotics and chemotherapy*, 2017. – Vol. 62. – № 7-8. 3. Greeshma P, Ravikumar K.S., Neethu M.N., Pandey M., Zuhara K.F., Janardhanan K.K. Antioxidant, anti-inflammatory, and antitumor activities of cultured mycelia and fruiting bodies of the elm oyster mushroom, *Hypsizygus ulmaris* (Agaricomycetes) // *International journal of medicinal mushrooms*, 2016. – Vol. 18. – №3. 4. Avtonomova A.V., Leontieva M.I., Isakova E.B., Krasnopolskaya L.M. Antitumor and antioxidant properties of polysaccharide extracts and fractions of *Hypsizygus ulmaris* submerged biomass. // *Biotechnology in Russia*, 2008. - № 2. – P. 23-29 5. Krasnopolskaya L.M., Shuktueva M.I., Avtonomova A.V., Yarina M.S., Dzhavakhyan B.R., Isakova E.B., Bukchman V.M. Antitumor and antioxidant properties of water-soluble polysaccharides from submerged mycelium of *Flammulina velutipes* // *Antibiotics and chemotherapy*, 2016. – Vol. 61. - № 11-12. – P. 16-20.

УДК 664.38: 644.53

## БИОИНЖЕНЕРИЯ БЕЛКОВЫХ КОМПОЗИТОВ ИЗ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

Колпакова В.В., Гайворонская И.С.

Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем имени В.М. Горбатова» РАН, Красково, Россия  
140051, Московская обл., Люберецкий район, п. Красково, ул. Некрасова, 11  
e-mail: val-kolpakova@rambler.ru

В работе рассмотрены принципы и цели создания белковых композитов из зерновых культур с целью повышения их пищевой, биологической ценности и функциональных свойств с использованием различных приемов

**Ключевые слова:** белковые композиты, зерновые культуры, состав, функциональные свойства

Белки являются важными компонентами питания человека, так как они являются строительным материалом основных частей тела, органов, тканей, включая мускулатуру, соединительные ткани, кожу, клетки крови, гормоны, ферменты. Увеличение численности населения планеты позволяет экспертам прогнозировать прогрессирующий дефицит белковой пищи. Накопленные знания в области генетики происхождения белков, их свойств, структуры, с одной стороны, и возрастающая потребность в белках для активного образа жизни, сокращения заболеваний, питания школьников, спортсменов, лиц, работающих в специальных условиях с другой, создают предпосылки развития совершенно новых технологий пищевых белков. Биоконверсия растительного сырья с использованием микроорганизмов пока не обеспечивает значительных успехов в получении альтернативных источников обязательного компонента пищи. Это резко повышает роль природных белков, усиливает значимость наукоемких технологий их получения и использования в виде новых композитных форм (модулей).

Производство злаковых культур уже в ближайшие годы может удовлетворить потребность человека в продуктах питания, но часто в последние необходимо вносить дополнительные белки, так как часто содержание белков в продуктах низкое, а состав важнейших аминокислот не сбалансирован. Предпочтение отдается пшеничным и соевым белкам, однако внимание привлекают препараты из гороха, чечевицы, фасоли, нута, люпина, ржи, овса, ячменя, тритикале, риса и т.д. Через новые формы белковых композитов (модулей) с включением в их состав биологически активных компонентов перспективно формировать более качественный фонд продовольственного белка для функциональных и специальных пищевых продуктов. С направленно измененным химическим составом и функциональными свойствами разработаны специальные приемы, обеспечивающие безопасность, повышенную пищевую, биологическую ценность композитов: из смесей зерновых культур, физико-химическими и биотехнологическими приемами.

Разработаны технологии белковых композитов состава белок-белок с комплементарным аминокислотным составом из смесей периферических частей зерна пшеницы, ржи, ячменя (крупка, отруби, шелуха) [1], гороховой муки, нута, продуктов переработки зерна тритикале на крахмал с хорошими функциональными свойствами и аминокислотным составом. Композиты обогащены лизином, треонином, серосодержащими аминокислотами. Создана целая серия порошкообразных композитов для применения их в качестве функциональных ингредиентов и одновременного придания пищевым изделиям профилактической направленности. Полимерные цепи белка с реакционными химическими группировками в составе эмульсии взаимодействуют с фосфоацилглицеринами, жирными кислотами, минеральными веществами и т.д., изменяя при этом функциональные свойства (водо-, жиросвязывающая способность, растворимость, жиroleмульгирующие свойства и т.д.) [2]. Фармакологическая направленность таких композитов позволяет решать проблемы профилактики сердечно-сосудистых, желудочно-кишечных заболеваний, диабета, аллергии, атеросклероза.. Они могут использоваться в составе модулей длительного хранения, для детского

питания, престарелых людей, школьников. Разработаны белково-жировые композиты со сбалансированным аминокислотным составом, лецитином, витаминами С, Е на основе белков зернобобовых и пшеничных отрубей. Медико-биологические испытания доказали положительное влияние их на уровень холестерина в крови животных. Белковые композиты из фасоли, сои, маша, гороха, чечевицы, пшеничных отрубей обеспечивали эффект истинного и простого обогащения.

Биотехнологическими приемами созданы также композиты с использованием гидролаз (эндо-, экзо-протеазы) и трансфераз (трансглутаминаза) с исследованием процессов их разработки, безопасности и свойств. Так, разработаны композиты из пшеничной клейковины и белков амаранта, белков риса и минерального компонента кальция и т.д. Созданы рекомендации по режимам приготовления композитов для обеспечения надлежащих свойств и функций, в противном случае они не могут выполнять заданную роль в составе пищи.

Литература:

1. Колпакова В.В., Кононенко В.В., Крикунова Л.Н. Белковые композиты из дифференцированных фракций зерновых культур // *Хранение и переработка сельхозсырья*. – 2002 – № 11. – С. 63 - 65.
2. Колпакова В.В., Мартынова И.В., Арапова Л.И., Чумикина Л.В. Физико-химические свойства и структурные особенности белково-липидных композитов повышенной пищевой ценности // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2004. – Т.40 – № 6. – С. 693 - 698.

УДК 664.38: 644.53

## BIOINGENERY OF PROTEIN COMPOSITES FROM CEREAL CROPS

**Kolpakova V.V., Gaivoronskaya I.S.**

*All-Russian Scientific Research Institute of Starch Products – a branch of Federal Research Center of Food Systems named after V.M. Gorbатов, SAS, Kraskovo, Russia.*

*140051, Moscow region, Lubertsy district, Kraskovo, Nekrasova street, 11*

*e-mail: val-kolpakova@rambler.ru*

In this data highlighted principles and aims of development of protein composites from cereal crops in order to improve the nutritional value, biological value and functional properties with usage of different methods .

**Key words:** protein komposites, cereal crops, composition, functional properties

Protein is one of the most important components in human nutrition, as they are a building material for main organs of human body: organs, tissues, including mussels, connective tissues, skin, blood cells, hormones, enzymes. Increasing of human population of the planet allows experts to predict a progressive deficit of protein foods. Accumulated knowledges from genetic of protein origin, their properties ,structure from one side and increasing of demands in proteins for active life style , decreasing of diseases, nutrition for school age children sport nutrition, nutrition of people who working in special conditions from other side, creates the prerequisites fot development of completely new technologies of food proteins . Bioconversion of plant raw materials with usage of microorganisms for today not yet provides a significant success in obtaining alternative sources of the mandatory components of nutrition . It's dramatically increasing the role of natural proteins, reinforces the importance of science-intensive technologies for their production and use in the form of new composite forms (modules).

Production of cereal crops in the coming years can satisfy human needs in food products, but very often it's necessary to enrich products in additional proteins, because often original quantity of protein in product are very low and amino acid score is not balanced. Preferences are given to proteins from wheat and soy, however, more and more proteins from pea , , bean, chickpea, lupine, rye, oats, barley, triticale, rice, etc. are attracting attention. Through the new forms of protein composites (modules) with inclusion into their composition biologically active components, it is promising to form more high quality fond of food proteins for functional and speciality food products. With a purposefully changed chemical composition and functional properties, special techniques have been developed to ensure safety, increased nutritional and biological value of composites: from mixtures of cereal crops, physicochemical and biotechnological methods.

Were developed the technologies of protein composites with protein-protein composition with complementary amino acid composition from mixtures of peripheral parts of wheat grain, rye, barley (grits, bran, husk) [1], pea flour. Composites are enriched in lysine, threonine, sulfur-containing amino acids. A whole series of powdered composites has been created for their use as functional ingredients and at the same time providing food products with a preventive orientation. Polymer chains of protein with reaction chemical groups in the emulsion interact with phosphoacylglycerols, fatty acids, minerals, etc., while changing the functional properties (water, liposity,

solubility, fat-emulsifying properties, etc.) [2]. The pharmacological orientation of such composites allow to solve the problems of preventing cardiovascular, gastrointestinal diseases, diabetes, allergies, atherosclerosis .. They can be used as a part of long-term storage modules, for baby food, for the elderly, for schoolchildren. Protein-fatty composites with a balanced amino-fatty acid composition, lecithin, vitamins C, E based on grain legumes and wheat bran have been developed. Medico-biological tests have shown a positive effect on cholesterol levels in animal blood. Protein composites from beans, soy, mung beans, peas, lentils, wheat bran provided the effect of true and simple enrichment.

Biotechnological methods also created composites using hydrolases (endo-, exoprotease) and transferases (transglutaminase) with research of their development processes, safety and properties. So, composites from wheat gluten and amaranth proteins, rice proteins and mineral calcium component, etc. have been developed. Recommendations are made on the modes of preparation of composites to ensure proper properties and functions, otherwise they can not fulfill a given role in the composition of food.

Biotechnological methods also created composites using hydrolases (endo-, exoprotease) and transferases (transglutaminase) with research of their development processes, safety and properties. So, composites from wheat gluten and amaranth proteins, rice proteins and mineral calcium component, etc. have been developed. Recommendations are made on the modes of preparation of composites to ensure proper properties and functions, otherwise they can not fulfill a given role in the composition of food.

#### References:

1. Kolpalova V.V., Kononenko V.V., Krikinova L.N. Protein composites from differentiated fractions of cereal crops // Storage and processing of agricultures– 2002 – № 11. – pp. 63 - 65.
2. Kolpakova V.V., Martynova I.V., Abramova L.I. Chumikina L.V. Physically-chemical properties and structure specialties of protein-lipidic composites with additional nutritional value // Applied biotechnology and microbiology – 2004. – T.40 – № 6. – Pp. 693 - 698.

УДК 637.1

## БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ БЕЛКИ МОЛОКА – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

**Ильина А.М., Харитонов Д.В.**

Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности

г.Москва, Россия

115093, г.Москва, ул. Люсиновская,35, корп.7

e-mail: gnu-vnimi@yandex.ru

Разработана технология получения комплекса биологически активных молочных белков - «лактопероксидаза-лактоферин-иммуноглобулин» (Л-ПФИ), показано его использование в качестве базы для БАД и меддиофилактических продуктов. Проведена апробация комплекса в технологии производства молочных продуктов.

**Ключевые слова:** биологически активные молочные белки, лактопероксидаза, лактоферрин, иммуноглобулин, антибактериальное действие, антиоксидантная активность

Анализ отечественных и зарубежных источников научно-технической и патентной информации свидетельствует о возрастающем интересе к применению различными группами населения биологически активных добавок и функциональных продуктов питания, обладающих различными физиологическими функциями. Основной причиной широкомасштабного развития рынка продуктов лечебно-профилактической направленности является постоянное ухудшение здоровья населения, вызванное как неблагоприятной экологической ситуацией, так и нарушением пищевого статуса.

Недостатки в структуре и качестве питания сопровождаются неспособностью соответствующих защитных систем организма адекватно отвечать на неблагоприятные воздействия окружающей среды, что резко повышает риск развития многих заболеваний. Поиск альтернативных путей решения этой важнейшей проблемы привел к необходимости разработки технологий получения комплексов биологически активных веществ из естественных источников.

Актуальным является использование в технологии пищевых продуктов и БАД биологически актив-

ных белков молока, которые играют многообразную роль и выполняют защитную, антимикробную, регенерирующую, антиоксидантную, иммуномодуляторную, регуляторную и другие функции. Перспективным направлением развития биотехнологии является получение биологически активных веществ молока с сохранением их биологической активности из вторичных молочных ресурсов, которые содержат комплекс специфических (иммуноглобулины различных классов) и неспецифических (катионные сывороточные белки; лактопероксидаза, лизоцим, лактоферрин, нуклеазы др.) белковых защитных компонентов. Особый интерес среди неспецифических компонентов вызывают лактопероксидаза и лактоферрин – полноценные по аминокислотному составу и характеризующиеся высокой биологической активностью сывороточные белки. Иммуноглобулины, представляя собой специфические защитные факторы молока, тесно связаны с неспецифическими и функционируют в комплексе с ними.

В связи с этим, разработана технология получения комплекса биологически активных белков молока «лактопероксидаза-лактоферрин-иммуноглобулин» (Л-ПФИ) для использования его в качестве основы БАД и продуктов лечебно-профилактической направленности. Создание комплекса белков осуществлялось с учетом природного соотношения компонентов в натуральном молоке, их взаимного влияния, биологической активности и безопасности. При разработке технологии получения комплекса «Л-ПФИ» был положен принцип безотходной переработки молочного сыря.

Изучены физико-химические, микробиологические и органолептические свойства разработанного комплекса, а также, питательная ценность и биологическая активность по показателям бантимикробное действие, антиоксидантная активность.

В экспериментах с животными исследована токсичность и влияние при пероральном приеме разработанного комплекса на устойчивость к стрессовым воздействиям.

Проведена апробация комплекса в технологии производства молочных продуктов.

Показана возможность повышения биологической и питательной ценности стерилизованного молока, так как процесс стерилизации сопровождается наиболее глубокими изменениями белковой фазы.

В условиях промышленности апробирована технология обогащения стерилизованного молока биологически активным комплексом «Л-ПФИ».

Введение в состав стерилизованного молока белкового комплекса позволило значительно повысить его биологическую ценность.

UDC 637.1

## THE BIOLOGICALLY ACIVE MILK PROTEINS – THE PERSPECTIVE COMPONENTS FOR DAIRY PRODUCTS DEVELOPMENT

Ilyina A.M., Kharitonov D.V.

*The Federal State Budget Scientific Institution All-Russian Dairy Research Institute "VNIMI" Moscow, Russia, Lusinovskaya str., 35/7, Moscow, 115093, Russia*

The technology for the complex of biologically active milk proteins – lactoperoxidaselactoferrin-immunoglobulin (LPI) has been developed and its usage as the base for BAS and medioprophyllactic products. Approbation of the complex in the technology of dairy products manufacture has been carried out.

**Key words:** biologically active milk proteins, lactoperoxidase, lactoferrin, immunoglobulin, antibacterial action, antioxidant activity

The analyses of native and foreign resources of scientific-technical and patent information testifies of the growing interest of different groups of population to biologically active additives and functional food products possessing different physiological functions. The basic reason of wide-range development of medioprophyllactic food products market is the constant degradation of the population health due to poor ecological situation as well as violation of food status.

The defects of the nutrition structure and quality are accompanied by inability of the appropriate defense of the body to respond adequately the unfavorable effect of the environment that sharply raises the risk of many diseases development. The search of the alternative ways of these important problems solving resulted in the necessity to develop the technology of producing the complex of biologically active substances from natural sources.

Usage of food products and milk protein biologically active substances which play diverse role and execute protective, antibacterial, regenerative, antioxidant, immunomodulatory, regulatory and other functions in the technology is very actual. The perspective branch in the development of biotechnology is production of biologically active milk substances keeping their biological activity from secondary milk resources which contain the complex of specific (immunoglobulines of different

classes) and nonspecific (cation whey proteins; lactoperoxidase, lysozyme, lactoferrin, nucleases, etc.) protein protective components. Among nonspecific components lactoperoxidase and lactoferrin – full value by amino-acid composition and characterized by high biological activity of whey proteins are of great interest. Immunoglobulins being specifically protective milk factors are tightly bounded with nonspecific and function in the complex with them.

As a result the technology of biologically active milk proteins" lactoperoxidase–lactoferrin-immunoglobulin" (L–PFI) complex production for its usage as BAS base and formedioprophylactic purpose has been developed. The creation of protein complex was executed considering the nature ratio of the components in natural milk, their interference, biological activity and safety. The principle of wasteless processing of milk raw material was assumed during the development of the complex "L-PFI" technology.

The physical-chemical, microbiological and sensory properties of the developed complex as well as nutritional value and biological, antioxidant activity and antibacterial action have been studied. During the experiments with animals toxicity and effect at oral intake of the developed complex on stability to stress situations. The approbation of the complex in the technology of dairy products manufacture has been carried out. The possibility to approve the biological and nutritional value of sterilized milk has been demonstrated as far as the process of sterilization was accompanied with deep changes of protein phase.

The technology of sterilized milk enrichment by biologically active complex 'L-PFI' on the industrial scale has been approved.

Introduction of protein complex into sterilized milk composition made it possible to improve its biological value.

УДК 663.5.004.8

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ЗЕРНОВОЙ БАРДЫ В СУХИЕ КОРМОВЫЕ ДРОЖЖИ

**Худякова Н.М., Лозанская Т.И., Римарева Л.В.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия  
111033 г. Москва, ул. Самокатная, 4б.  
e-mail: lrimareva@mail.ru*

Разработана технология промышленной переработки натуральной зерновой барды в сухие кормовые дрожжи, которая внедрена на ряде спиртовых заводов России и Республики Беларусь. Качество получаемых кормовых дрожжей соответствует ГОСТ Р 55301-2012.

**Ключевые слова:** зерновая барда; дрожжи кормовые; сырой протеин.

Развитие производства кормовых дрожжей из зерновой барды способствует обеспечению кормовой базы животноводства высокопереваримым белком и витаминами. 1 кг кормовых дрожжей в качестве источника белкового концентрата и жизненно важных для развития животных витаминов равноценен 4,5-5 кг зерна ячменя или овса. Исследованиями установлена полная безвредность кормовых дрожжей для животных и возможность их использования в сельском хозяйстве в качестве белково-витаминной добавки к основному корму.

Кормовые дрожжи получают культивированием специально подобранных штаммов дрожжей на цельной зерновой барде. Качество производимого кормового продукта соответствует ГОСТ Р 55301-2012. Около 50 % общей массы кормовых дрожжей, выпускаемых спиртовыми заводами, составляет протеин, причем переваримость его у КРС достигает 85 %, у свиней – 89 %. Кормовые дрожжи из зерновой барды содержат сырого протеина 43-54 %, клетчатки 1-3 %. В состав белка кормовых дрожжей входят 20 аминокислот, в том числе все 10 незаменимых аминокислот. Особенно богаты кормовые дрожжи лизином: в 1 кг содержится 33 г лизина [1]. Практикой установлена средняя норма использования сухих кормовых дрожжей в рационах с/х животных и птицы: 1 г в сутки на 1 кг живой массы животного. На основе сухих кормовых дрожжей можно организовать производство кормовых смесей, используя для этого отходы других пищевых производств: пшеничные и ржаные отруби, шрот, жмых и др., что позволит пользоваться льготной ставкой НДС на готовый продукт в размере 10 %.

*Литература:*

*1. Римарева Л.В., Лозанская Т.И., Худякова Н.М. Дрожжи из зерновой барды – природный премикс // Животноводство России. – 2015. - № S2. – С. 41.*

UDC 663.5.004.8

## BIOTECHNOLOGICAL PROCESSING OF GRAIN STILLAGE INTO DRY FEED YEAST

**Khudyakova N.M., Lozanskaya T.I., Rimareva L.V.**

*All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology – a branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia.*

*4b Samokatnaya str., Moscow, 111033, Russia.*

*e-mail: lrimareva@mail.ru*

Developed technology of industrial processing of natural grain stillage into dry feed yeast, which is embedded in a number of distilleries of Russia and Belarus. The quality of fodder yeast GOST R 55301-2012.

**Key words:** grain stillage, fodder yeast, crude protein.

The development of production of fodder yeast from grain stillage contributes to livestock forage vysokoperevarimy protein and vitamins. 1 kg of fodder yeast as a source of protein concentrate and vital for the development of the animal vitamins equivalent to 4,5-5 kg of grains of barley or oats. Research has established full innocence of fodder yeast for animals and the possibility of their use in feeding.

Fodder yeast is produced by cultivation of specially selected strains of fodder yeast on a solid grain stillage. The quality of manufactured feed product complies with GOST R 55301-2012. About 50 % of the total mass of fodder yeast produced alcohol plants, is protein, and its digestibility in cattle is 85 %, in pigs – 89 %. Fodder yeast from grain stillage contain crude protein 43-54 %, fiber 1 % to 3 %. The composition of feed yeast protein consists of 20 amino acids including all 10 essential amino acids. Particularly rich fodder yeast lysine: in 1 kg contains 33 grams of lysine. Practice set the average utilization rate of dry fodder yeast in the diest of farm animals and poultry: 1 g per day per 1 kg live weight of the animal. On the basis of dry fodder yeast, you can organize the production of feed mixtures, using the waste of other food production: wheat and rye bran, meal, cake, and other. This will allow you to enjoy VAT rate on the finished product at the rate of 10 %.

*References:*

*1. Rimareva L.V., Lozanskaya T.I., Khudyakova N.M. The yeast from grain stillage is a natural premix // Animal Russia. – 2015. – № S2. – p. 41.*

*УДК 663.11: 579.87*

## **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНВЕРСИИ БИОМАССЫ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ – ПРОДУКТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ ПОЛИСАХАРИДОВ И БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НАТУРАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ**

**Серба Е.М., Римарева Л.В., Мочалина П.Ю., Оверченко М.Б., Погоржельская Н.С., Антонова А. А.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия*

*111033, г. Москва, ул. Самокатная, д.4-Б,*

*E-mail: serbae@mail.ru*

Установлена возможность использования гриба *Aspergillus oryzae* для создания технологии получения пищевкусковых и функциональных ингредиентов на основе ферментированного растительного сырья.

**Ключевые слова:** *Aspergillus oryzae*, биомасса, ферментативный гидролиз, аминокислотный состав, полисахариды, пищевые ингредиенты.

В настоящее время актуальны вопросы полноценного обеспечения пищевых потребностей населения, которые могут быть решены путем использования инновационных методов производства пищевых продуктов с привлечением биомассы микроорганизмов. Научно-практическую ценность этой проблемы обеспечивает не только способность микроорганизмов синтезировать полезные в промышленном производстве вещества, но и возможностью использовать продуцируемую ими биомассу в роли субстрата для получения пищевых ингредиентов [1,2].

В качестве объекта исследований использовали селекционированный ранее мутантный штамм микромицета *Aspergillus oryzae* RCAM 01133. Штамм отличается высокой скоростью роста, накоплением

белка и полисахаридов, способностью к пониженному спорообразованию при твердофазном культивировании, что делает его перспективным для использования в биотехнологии получения функциональных добавок.

Исследован процесс направленного биосинтеза мицелиальной биомассы на натуральных средах, содержащих пшеничные отруби, соевый шрот, сухую барду, каротиноидные дрожжи в различных вариациях. Установлено, что наиболее высокие биохимические показатели микробной биомассы были получены при культивировании гриба на соевом шроте и зерновой барде. Анализ аминокислотного состава полученных образцов микробной биомассы показал повышение содержания незаменимых аминокислот (44,5 и 41,0% от их общего количества), а также уровня белковых веществ в 1,5 раза, что подтверждает их высокую биологическую ценность и позволит получать белково-аминокислотные обогатители пищи.

На среде с пшеничными отрубями и зерновой бардой достигнут наиболее высокий уровень синтеза полисахаридов, что может быть использовано в технологиях получения биопрепаратов с высоким содержанием ценных полисахаридов и пищевых волокон.

Исследован процесс направленной ферментативной конверсии грибной биомассы с целью получения ферментализатов с различной степенью деструкции белковых веществ и полисахаридов. Для биодеструкции полимеров биомассы использовали различные комплексы ферментов, включающие комплекс протеаз и ферменты, гидролизующие небелковые полимеры, а также учитывалось наличие собственных внутриклеточных ферментов гриба. Подобраны ферментные системы целевого назначения, обеспечивающие получение ферментализатов мицелиальной биомассы, содержащих низкомолекулярные пептиды и свободные аминокислоты.

Установлена возможность использования гриба *A. oryzae* RCAM 01133 для создания технологии получения пищевкусных и функциональных добавок на основе ферментированного растительного сырья.

#### Литература:

1. Курбатова Е.И., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Давыдкина В.Е., Римарева Л.В., Поляков В.А., Погоржельская Н.С. Микромицет *Aspergillus foetidus* - продуцент комплекса гидролитических ферментов // Микология и фитопатология. 2017. Т. 51. № 1. С. 34-40.
2. Гулич М.П., Емченко Н.Л., Каплуненко В.Г., Яценко О.В., Ермоленко В.П., Харченко О.О., Моисеенко И.Е. Пищевая и биологическая ценность мицелия гриба *Ganoderma lucidum*, культивируемого на питательной среде, обогащенной цитратами цинка и германия // Микроэлементы в медицине. 2014. Т. 15. № 1. С. 13-19.

UDC 663.11: 579.87

## BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF CONVERSION OF BIOMASS OF MISCIAL FUNGUS – PRODUCTIVE SOURCES OF POLYSACCHARIDES AND OF PROTEINS FOR THE CREATION OF NATURAL FOOD INGREDIENTS

Serba E. M., Rimareva L. V., Mochalin P. Yu., Overchenko M. B., Pogorzelska N.S., Antonov A. A.

All-Russian research Institute of food biotechnology is a branch of Federal state budget institution of science "Federal research center of food, biotechnology and food safety", Moscow, Russia  
111033, Moscow, str. Samokatnaya, 4-B,  
E-mail: serbae@mail.ru

The possibility of using the fungus *Aspergillus oryzae* for the creation of technology for the food and functional foods based on fermented plant materials.

**Key words:** *Aspergillus oryzae*, biomass, enzymatic hydrolysis, amino acid composition, polysaccharide, food ingredients.

Currently topical issues provide full nutritional needs of the population, they can be solved using innovative methods of food production with the involvement of the microbial biomass. Scientific and practical value of this problem provides not only the ability of microorganisms to synthesize useful in the industrial production of substances, but also the opportunity to use their produced biomass as substrate for production of food ingredients.

The object of the studies used a previously selected mutant strain of micromycete *Aspergillus oryzae* RCAM 01133. The strain has a high growth rate, accumulation of protein and polysaccharides, the ability to reduced sporulation during solid cultivation, which makes it promising for use in biotechnology for functional additives.

The process of directed biosynthesis mycelial biomass in natural environments containing wheat bran, soybean meal, dry vinasse, carotenoid yeast in different variations. It was found that the highest microbial biomass

biochemical parameters were obtained by culturing the fungus on soybean meal and corn stillage. Analysis of amino acid composition of the microbial biomass obtained samples showed elevated levels of essential amino acids (44.5 and 41.0% of the total), as well as protein substances level of 1.5 times, which confirms their high biological value and allow to obtain protein-amino acid food enrichers.

On the medium with wheat bran and grain bard reached the highest level of synthesis of polysaccharides that can be used in technologies of production of biopreparations with a high content of valuable polysaccharides and dietary fiber.

The process directed enzymatic conversion of the fungal biomass with the purpose of obtaining fermentaiton with different degree of degradation of proteins and polysaccharides. For biodegradable polymers biomass used various complexes of enzymes, including the complex of proteases and enzymes hydrolyzing non-protein polymers, and also took into account the presence of its own intracellular enzymes of the fungus. Matched enzyme system purpose, generating fermentaiton mycelial biomass containing low molecular weight peptides and free amino acids.

The possibility of using the fungus *A. oryzae* RCAM 01133 for the creation of technology for the food and functional additives based on fermented plant materials.

#### References:

1. Kurbatova E. I., Sokolova E. N., Borshchev, Y. A., Davydkina V. E., Rimareva L. V., Polyakov V. A., Pogorzhska N. S. *The micromycete Aspergillus foetidus - producer of complex hydrolytic enzymes // Mycology and Phytopathology. 2017. T. 51. No. 1. Pp. 34-40.*
2. Gulich M. P., Yemchenko N. L., Kaplunenko V. G., Yashchenko O. V., Ermolenko V. P., Kharchenko O. A., Moiseenko I. E. *Nutritional and biological value of the mycelium of the fungus Ganoderma lucidum cultivated in a nutrient medium enriched with zinc and citrate Germany // Microelements in medicine. 2014. T. 15. No. 1. Pp. 13-19.*

УДК 577.11, 577.15, 675.92.026.2, 67.017

## ВЛИЯНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ГЛЮТЕНА НА ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И ДЕФОРМАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЛОКНИСТЫХ УПАКОВОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Захаров И.В., Захарова Н.Л., Канарский А.В., Казаков Я.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»), Казань, Россия, 420015, Казань, ул. Л. Толстого, д.8  
e-mail: zaharvv1991@mail.ru

Показана целесообразность ферментативной обработки глютена пшеничного для повышения прочностных и деформационных характеристик волокнистых материалов и устойчивость их к старению.

**Ключевые слова:** глютен, ферментирование, физико-механические свойства волокнистых материалов

В настоящее время на волокнистые упаковочные материалы наносятся традиционные пластмассы, в частности ПЭ, ПП, ПС и ПЭТФ, а также вводятся в композицию формальдегидные смолы для придания прочности в сухом и влажном состояниях этих материалов. Однако такие волокнистые материалы сложно подвергаются вторичной переработке, и не подлежат экономически эффективной утилизации. В этой связи, поиск полимерных веществ, для улучшения свойств волокнистых материалов весьма актуален.

Цель настоящей работы - разработка способа ферментативной обработки глютена для повышения физико-механических и деформационных характеристик волокнистых упаковочных материалов.

Установлено, что пропитка волокнистого упаковочного материала глютенем, обработанного ферментными препаратами, увеличивает прочностные и деформационные характеристики: растяжимость до 29 % - пентопаном 500 БГ, жесткость до 96 % - фунгамиллом, разрушающую нагрузку до 54 % - фунгамиллом, влапрочность до 54 % - пентопаном 500 БГ по отношению к контрольному образцу картона.

Установлено, что пропитка биомодифицированным глютенем картона, в процессе его хранения (исследован период 4 месяца), увеличивает:

- величину напряжения при растяжении картона, при обработке глютена смесью пентопан 500 БГ, L-цистеин и транслгутаминазы в сухом и во влажном состояниях до 30 %;
- величину удлинения при растяжении, в сухом состоянии при обработке глютена нейтразой до 70 %, во



влажном – трансглутаминой до 30 %;

- величину жесткости, при обработке глютена пентопаном моно БГ до 16 %.

Полученные результаты показывают потенциальную возможность применения биокаталитической обработки глютена для повышения физико-механических и деформационных характеристик бумаги и картона.

UDK 577.11, 577.15, 675.92.026.2, 67.017

## THE IMPACT OF BIOCATALYTIC PROCESSING OF GLUTEN ON PHYSICO-MECHANICAL AND DEFORMATION CHARACTERISTICS OF FIBROUS PACKING MATERIALS FOR FOOD PRODUCTS

Zakharov I. V., Zakharova N. L., Kanarskiy A.V., Kazakov Y. V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kazan National Research Technological University" ("KNRTU") Kazan, Russia,  
420015, Kazan, L. Tolstoy st. 8  
e-mail: zaharvv1991@mail.ru

The expediency of enzymatic processing of wheat gluten to enhance the strength and deformation characteristics of fibrous materials and their resistance to aging.

**Key words:** gluten, fermentation, physical-mechanical properties of fibrous materials

Currently, fiber materials are applied to traditional plastics, in particular PE, PP, PS and PET, and also enter into the composition of the formaldehyde resin for strength in dry and wet conditions of these materials. However, such fibrous materials are difficult to recycling, and are not cost-effective disposal. In this regard, the search for polymeric substances to improve the properties of fibrous materials is very relevant.

The aim of this work is to provide a method for enzymatic treatment of gluten to improve the physical, mechanical and deformation characteristics of fibrous packaging materials.

It is established that impregnation of the fibrous packaging material is gluten, processed enzyme preparations increases the strength and the deformation characteristics: stretch up to 29 % - pentopan 500 BG, the hardness of up to 96 % fungamyl, breaking load of up to 54 % fungamyl, wet strength up to 54 % - pentopan 500 BG relative to the control sample board.

It is established that impregnation biomodification gluten cardboard, in the process of its storage (the period studied for 4 months) increases:

- the magnitude of the tensile stress of the cardboard, in the processing of the gluten mixture pentopan 500 BG, L-cysteine and transglutaminase in dry and in wet conditions up to 30 %;
- the amount of elongation, in a dry condition during the processing of gluten by neutrase to 70% in the wet – transglutaminase to 30 %;
- the amount of rigidity, while processing gluten pentopan mono BG 16 %.

The results show the potential use of biocatalytic processing of gluten to improve the physical-mechanical and deformation characteristics of paper and paperboard.

УДК 637.1.

## ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ И УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА БЕЛКОВЫЙ И СОЛЕВОЙ СОСТАВ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Харитонов В.Д., Юрова Е.А., к.т.н., Кобзева Т.В., Мельденберг Д.Н., Семенова Е.С.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия  
115093, Москва, ул. Люсиновская, д.35, корп.7  
e-mail: [ilmoloko@mail.ru](mailto:ilmoloko@mail.ru)

Установлено влияние времени и условий хранения на изменения белкового и солевого состава молока сырого и молочных продуктов. Проведенные исследования позволили отметить важность определения белкового и солевого состава молока как для оценки качества и безопасности молока, так и для идентификации, а также установить необходимость такой оценки молока сырого для выработки качественных молочных продуктов.

**Ключевые слова:** молоко сырое, молочные продукты, белковый состав, сывороточные белки, хранение, условия хранения, солевой состав

Молоко представляет собой сложную биологическую систему, которая под влиянием различных факторов лабильно изменяет свои свойства и параметры и, соответственно, имеет ограниченные сроки годности. А в настоящее время наиболее актуально установление сроков годности молочных продуктов, вырабатываемых с применением современных технологий и с различным составом. Данное обстоятельство привело к тому, что при установлении сроков годности продукта учитываются микробиологические факторы порчи и изменения жирового состава продукта, а изменение других составных частей молока в процессе хранения, в частности белкового и солевого состава, не учитывается вовсе.

В связи с тем, что в белковый состав молока в процессе хранения значительно подвержен изменению, а основные группы белков: казеиновая фракция, сывороточные белки и белки оболочек жировых шариков взаимосвязаны с солями и металлами, то необходимо оценивать не количественное содержание каждой группы белков, хотя это и очень важно, а образующие в процессе хранения комплексы и промежуточные соединения. Наряду с белками, в молоке содержатся азотистые соединения небелкового характера: свободные аминокислоты, пептиды, мочевины, аммиак, мочевая кислота и др. Поэтому очень важно понимать какая трансформация данных соединений происходит в процессе хранения.

Полученные в результате исследований данные свидетельствуют об изменениях белкового состава молока. После 6-ти суток хранения во всех исследованных образцах сырого молока наблюдалось повышение содержания сывороточных белков. Содержание казеиновых белков снизилось на 0,02%, что, вероятно, обусловлено процессами протеолиза в молоке, вызванными как ферментами, так и гидролизом белка при нарастании кислотности. Отмечено изменение содержания небелкового азота - в среднем на 2-3% в молоке сыром в процессе хранения, а в молочных продуктах увеличение наблюдалось в 1,5 раза, что приводило к нарастанию аммиака в продукте и появлению продуктов гидролиза в процессе хранения.

Оценивая солевой состав молока сырого как свежего, так и в процессе хранения было установлено, что значительным колебаниям подвергаются такие анионы, как хлориды, фосфаты и цитраты, в первую очередь отмечено увеличение содержания фосфатов и цитратов, немного снижалось содержание хлоридов. При этом в ряде образцов сырого молока отмечалось образование таких солевых остатков, как азиды. В молочных продуктах также наблюдалось изменение солевого состава в процессе хранения.

Проведенные исследования позволили отметить важность определения белкового и солевого состава молока как для оценки качества и безопасности молока, так и для идентификации. В ходе проведения исследований были разработаны методики измерений фосфатов, цитратов, хлоридов и других анионов, что позволило не только определять солевой состав молока, но и устанавливать сортность молока и его пригодность для выработки качественных молочных продуктов.

UDC 637.1

## INFLUENCE OF TIME AND STORAGE CONDITIONS ON THE PROTEIN AND SALT COMPOSITION OF DAIRY PRODUCTS

**Kharitonov V.D, Yurova E.A, c.t.sc., Kobzeva T.V, Meldenberg D.N, Semenova E.S.**

*Federal State Budget Scientific Institution "All-Russian Scientific Research Institute of Dairy Industry", Moscow, Russia  
115093, Moscow, st. Lyusinovskaya, 35, building 7  
e-mail: ilmoloko@mail.ru*

Influence of time and storage conditions on changes of protein and salt composition of raw milk and dairy products is established. The conducted researches have allowed to note importance of determination of protein and salt composition of milk as for assessment of quality and safety of milk, and for identification and also to establish the need of such assessment of raw milk for development of qualitative dairy products.

**Key words:** raw milk, dairy products, protein composition, whey proteins, storage, storage conditions, salt composition

Milk represents difficult biological system which under the influence of various factors labilely changes the properties and parameters and, respectively, has limited shelf life. And now the establishment of the shelf life of dairy products produced with the use of modern technologies and with different composition is the most relevant. This circumstance has led to the fact that at establishment of the shelf life of the product microbiological factors of spoilage and changes in the fat composition of the product are considered, and the change in other components of milk during storage, in particular protein and salt composition, isn't considered at all.

Due to the fact that the protein composition of milk during storage is significantly affected by the change, and the main groups of proteins: casein fraction, whey proteins and proteins of fat globule membranes are interrelated with salts and metals, it is necessary to evaluate not the quantitative content of each group of proteins, although this is very important, but forming complexes and intermediate compounds during storage. Along with proteins, milk contains nitrogenous compounds of non-protein nature: free amino acids, peptides, urea, ammonia, uric acid, and etc. Therefore it is very important to understand what transformation of these compounds occurs during storage.

The data obtained from the studies confirm changes in the protein composition of milk. After 6 days of storage, an increase in content of whey proteins was observed in all samples of raw milk. The content of casein proteins decreased by 0.02%, which is probably due to the processes of proteolysis in milk caused by both enzymes and hydrolysis of the protein with increasing acidity. Change of content of non-protein nitrogen was noted - on average for 2-3% in raw milk during storage, and in dairy products an increase was observed by 1.5 times, that led to increase of ammonia in the product and the appearance of hydrolysis products during storage.

Estimating salt composition of raw milk both fresh, and during storage it has been established that such anions as chlorides, phosphates and citrates are exposed to considerable fluctuations, first of all increase in the content of phosphates and citrates is noted, the content of chlorides decreased a little. At the same time in some samples of raw milk, the formation of salt residues such as azides was noted. In dairy products there was also a change in salt composition during storage.

The carried out researches have allowed to note importance of determination of protein and salt composition of milk both for estimation of quality and safety of milk, and for identification. During researches measurement methods of phosphates, citrates, chlorides and other anions have been developed that has allowed not only to determine salt composition of milk, but also to establish grade of milk and its suitability for development of qualitative dairy products.

УДК 664.346

## ВЛИЯНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ НА МИКРОБИЛОГИЧЕСКУЮ СОХРАННОСТЬ МАЙОНЕЗА

**Рахимова Э.И., Сироткин А.С.**

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия  
420015, г. Казань, ул. К.Маркса, дом 68  
e-mail: elvira.r07@mail.ru

Исследовано влияние применения молочных продуктов при производстве майонеза на его качественные показатели. Обнаружено, что майонезы, содержащие в составе молочные компоненты, не подлежат длительному хранению вследствие развития молочнокислой микрофлоры, вызывающей порчу продукции.

**Ключевые слова:** майонез, молочнокислые бактерии, кислотность.

Проблема продления сроков годности масложировой продукции приобрела очень важное значение. Как известно, майонезы представляют собой эмульсии, поэтому продление срока их годности необходимо рассматривать с двух сторон: повышение микробиологической стойкости водной фазы и снижение скорости окисления жировой фазы.

Согласно литературным данным, для повышения микробиологической стойкости майонеза используют следующие технологические приемы: повышение степени дисперсности частиц эмульсии, использование нескольких ступеней водоподготовки, исключение сахара из рецептуры и замена его на подсластители, повышение кислотности готового продукта.

Основные компоненты майонеза (белки, жиры, углеводы) представляют собой хорошо усвояемые субстраты для развития микроорганизмов, таких как бактерии, плесневые грибы и дрожжи, которые вызывают его порчу.

Известно, что, при производстве майонеза не используются промышленно полезные микроорганизмы. В продукте может находиться только контаминирующая микрофлора, привнесенная вместе с остаточной микрофлорой компонентов майонеза. Попадая извне, они вызывают различные виды порчи продукта.

Таким образом, проведение микробиологических исследований образцов майонеза в целях выявления в них микроорганизмов, а также наблюдение за развитием микрофлоры в зависимости от времени и состава майонеза остается актуальной задачей для производителей масложировой продукции.

Исследовались образцы экспериментальных партий майонеза, изготовленного с введением в состав продукта сухого молока в количестве 0,5%, а также без сухого молока. В качестве консерванта использовали сорбат калия.

В ходе работы были применены: определение БГКП с помощью посевов на среду Эндо; диагностика количества дрожжей и плесеней чашечным методом на среде Сабуро и микроскопированием препаратов; диагностика количества молочнокислых бактерий; определение кислотности майонеза. При этом известно, что молочнокислые бактерии не регламентируются в майонезе.

Следует отметить, что в исследованных образцах отсутствовали БГКП, что положительно характеризует технологию получения экспериментальных партий майонеза. При этом важно, что в процессе инкубирования не было отмечено развития плесневых грибов и дрожжей. Это объясняется тем, что консервант сорбат калия проявляет фунгистатическое действие, подавляя развитие дрожжей и плесневых грибов. Необходимо отметить, что сорбат калия не подавляет рост молочнокислой флоры.

Значительные изменения микробиологической картины исследуемых образцов майонеза в процессе хранения наблюдались для молочнокислых бактерий, развитие которых обусловило повышение кислотности продукта, что характеризует порчу продукта, определяемую также органолептически.

Очевидно, что причиной развития и роста молочнокислых бактерий могут являться молочные компоненты в составе майонеза, которые являются субстратом для микроорганизмов в случае обсемененности сырья.

Проведенные исследования показали, что майонез, содержащий в составе молочные компоненты, не подлежит длительному хранению вследствие развития молочнокислой микрофлоры, вызывающей порчу продукции; содержание молочнокислых бактерий в майонезе не нормируется, однако, их развитие приводит к порче продукции при хранении по причине роста кислотности и ухудшения органолептических свойств; консервант сорбат калия не подавляет рост и развитие молочнокислых бактерий.

Таким образом, выявлено, что для увеличения срока хранения майонеза в процессе его производства

необходимо использовать биологически доброкачественное сырьё, строго соблюдать рецептуру продуктов, условия хранения и санитарно-гигиенические требования. При этом требуется осуществлять контроль и регламентирование содержания молочнокислых бактерий в готовых продуктах, приготовленных по различной рецептуре.

Литература:

1. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 024/2011 на масложировую продукцию (с изменениями на 23 апреля 2015 года).
2. Есина Е.С., Ливинская С.А., Скляренко Ю.С., Войно Л.И. Влияние глюкозооксидазы на микробиологическую сохранность майонеза // *Масла и Жиры*. - 2005. - №10.
3. Ливинская С.А., Ильяшенко Н.Г. Влияние качества сахара на качество комбинированных продуктов питания // *Масла и Жиры*. - 2003. - №5.
4. ГОСТ 10444.12 Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов.
5. ГОСТ 10444.11-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных.

УДК 664.346

## THE INFLUENCE OF LACTIC ACID BACTERIA ON THE MICROBIOLOGICAL SAFETY OF MAYONNAISE

Rakhimova E.I., Sirotkin A.S

Kazan national research technological University, Kazan, Russia

68, K.Marx Street, Kazan, 420015, Russia

e-mail: elvira.r07@mail.ru

**Abstract:** The influence of the use of dairy products in the production of mayonnaise on its quality indicators. Discovered that mayonnaise containing milk components are not subject to long-term storage due to the development of lactic acid bacteria that cause spoilage of products.

**Key words:** mayonnaise, lactic bacterium, acidity.

The problem of extending shelf life of fat and oil products has become very important. As you know, the mayonnaise are emulsions and therefore extending their shelf life must be considered from two sides: improving the microbiological resistance of the aqueous phase and reducing the rate of oxidation of fatty phase.

According to the literature, to improve the microbiological resistance of mayonnaise using the following processing methods: increasing the degree of dispersion of the particles of the emulsion, the use of several stages of water treatment, the exclusion of sugar from the recipe and replacing it with the sweetener, increasing the acidity of the finished product..

The main components of mayonnaise (proteins, fats, carbohydrates) are well-utilizable substrates for microbial growth such as bacteria, fungi and yeast that cause its damage.

It is known that, in the production of mayonnaise is not used useful industrial microorganisms. The product can only be contains a microflora introduced with the residual microflora of the components of the mayonnaise. Once outside, they cause different types of spoilage.

Thus, the conduct of microbiological tests of samples of mayonnaise in order to identify them in microorganisms, as well as monitoring the development of microflora depending on time and composition of mayonnaise is an urgent task for the manufacturers of oil and fat products.

We studied the samples of experimental batches of mayonnaise, made with the introduction of the product dry milk in 0.5%, and no milk powder. As preservative used is potassium sorbate.

During the work were applied: determination of coliforms with the help of crops on the environment Endo; diagnostics the number of yeast and moulds pan method on the environment Saburo and microscopy products; diagnostics the number of lactic acid bacteria; determination of acidity of mayonnaise. It is known, that lactic acid bacteria are not regulated in mayonnaise.

It should be noted that in the studied samples coliforms were absent, which qualifies the technology for the production of experimental batches of mayonnaise. It is important that in the process of incubation has not been observed growth of mold fungi and yeast. This is because the preservative potassium sorbate exhibits fungistatic, inhibiting the development of yeasts and molds. It should be noted that potassium sorbate does not inhibit the growth of lactic flora.

Significant changes in the microbiological picture of mayonnaise samples during storage was observed for lactic acid bacteria, the development of which has led to an increase in the acidity of the product, which characterizes

damage of the product, also determined organoleptically.

It is obvious that the reason for the development and growth of lactic acid bacteria can be dairy components in the composition of mayonnaise, which is a substrate for microorganisms in the case of contamination of raw materials.

The studies showed that mayonnaise containing milk components that are not subject to long-term storage due to the development of lactic acid bacteria that cause spoilage of products; maintenance of lactic acid bacteria in mayonnaise is not standardized, however, their development leads to damage of products during storage due to increase of acidity and deterioration of organoleptic properties; preservative potassium sorbate does not inhibit the growth and development of lactic acid bacteria.

Thus, it was revealed that to increase the shelf life of mayonnaise in the process of its production it is necessary to use biologically benign raw material, to adhere strictly to the formulation of the products, storage conditions and hygiene requirements. This requires to monitor and regulate the content of lactic acid bacteria in the finished products prepared according to different recipes.

#### References:

1. *Technical regulations of the Customs Union TR CU 024/2011 on fat and oil products (amended on 23 April 2015).*
2. E. S. Esina, S. A. Livinskaya, Y. S. Sklyarenko, L. I. Voyno, MGUPP *the Effect of glucose oxidase on the microbiological safety of mayonnaise // Oil and Fats. - 2005. - No. 10.*
3. S. A. Livinskaya, N. G. Ilyashenko *The effect of sugar quality on the quality of the combined food // Oil and Fats. - 2003. - No. 5.*
4. GOST 10444.12 *food. Method for the determination of yeasts and molds.*
5. GOST 10444.11-2013 *Microbiology of food and animal feed.*

УДК 616.34-008,18; 616.34-008.6; 664.865

## ВЛИЯНИЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ИНСТАНТНОЙ КОМПОЗИТНОЙ СМЕСИ НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ЖЕЛУДОЧНОКИШЕЧНОГО ТРАКТА ПРИ КИШЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Демидова Т. И. <sup>1</sup>, Демидов Д. А. <sup>2</sup>, Юдина Т. П. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия 125315, Москва, Волоколамское шоссе, д. 11  
e-mail: DemidonaTI@mgupp.ru

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова, Москва, Россия, 127473, Москва, ул. Делегатская, д.20, стр.1

Эффективность влияния энтеральной тера-пии с использованием специализированной инстантной композитной смеси показал анализ структурных изменений в слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта в группе больных с синдромом кишечной недостаточности.

**Ключевые слова:** синдром кишечной недостаточности, иммунопротективное влияние, патоген-нетический принцип развития «порочного круга».

Синдром кишечной недостаточности сопровождается порталной токсемией и бактериемией [3], которая усугубляет тяжесть тече-ния эндогенной интоксикации. Поэтому в комплексной терапии важное место занимают различные способы сорбционной детоксикации [1,2].

Исследование влияния специализированной инстантной композитной смеси (СИКС) на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта проводили у хирургических больных с синдромом кишечной недостаточности.

В нашем исследовании использовали СИКС, полученную на основе пектинсодержащих экстрактов вторичных сырьевых ресурсов (0,7-1,0% пектина) и сублимированного порошкового кисломолочного продукта с пробиотическими свойствами и способностью микрофлоры синтезировать витамин С и витамины группы В (В6,В12).

В клинических условиях СИКС применяли через назоинтестинальный зонд курсом 5-7 суток.

Исследовали биоптаты слизистой оболочки желудка, тощей и сигмовид-ной кишки в двух группах больных по десять человек парной вы-борки с перито-нитом различной этиологии, который был осложнен синдро-мом кишечной не-достаточности (СКН).

В 1-й группе проводили традицион-ное лечение, во 2-й группе дополнительно применили энтеральную

СИКС. Биопсию у всех больных выполняли на 7-е сутки лечения.

В 1-й группе больных гистологическая картина гастробиоптатов соответствовала хроническому гастриту в стадии обострения - 2-й степени активности (рис. 1). Морфологическая картина в слизистых оболочках желудка, тощей кишки и толстой кишки подтверждает патогенетический принцип развития «порочного круга» при СКН, когда патология в одном из отделов стенки пищеварительной системы ведёт к её повреждению в целом.

Во 2-й группе, где в комплекс лечения входила энтеральная терапия СИКС, гистологическая картина слизистых оболочек желудка, тощей кишки и сигмовидной кишки значительно отличается от таковой в предыдущей группе (рис. 2). В слизистой оболочке тощей кишки отмечались незначительные изменения.

Иммунопротективное влияние СИКС определялось наличием лимфоидных фолликулов рисунки. Под воздействием СИКС в слизистой оболочке толстой кишки отмечено отсутствие деструктивных процессов и усиление пролиферации, особенно эпителия кишечных крипт.

Морфологические проявления более благоприятного эффекта лечения отражаются в хронизации воспалительного процесса без проявлений обострения.

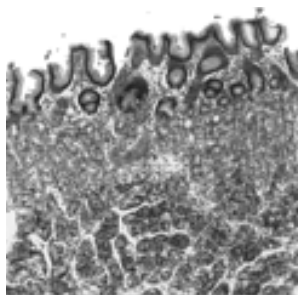


Рисунок 1.

Морфология слизистой оболочки желудка при лечении без СИКС

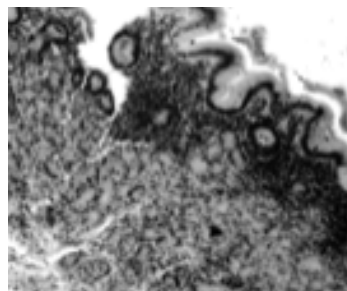


Рисунок 2.

Морфология слизистой оболочки желудка при лечении с СИКС

#### Литература:

1. Ватазин А.В., Лобаков А.И., Фомин А.М. Гемофилтрация при синдроме полиорганной недостаточности у больных с перитонитом. М., «М-Око», 1997, 140 с.
2. Гельфанд Б.Р., Матвеев Д.В., Сергеева Н.А. и др. Роль портальной бактериемии и эндотоксемии в патогенезе полиорганной недостаточности при перитоните. Хирургия, 1992, № 1, с. 21-27.
3. Попова Т.С., Тамазошвили Т.Ш., Шестопалов А.Е. Синдром кишечной недостаточности в хирургии. М., Медицина, 1991, 240 с.

UDC 616.34-008.18; 616.34-008.6; 664.865

## THE IMPACT OF SPECIALIZED FOREIGN COMPOSITE MIXTURES ON THE MUCOUS MEMBRANE OF THE GASTROINTESTINAL TRACT AT THE INTESTINAL INSUFFICIENCY

Demidova T. I. <sup>1</sup>, Demidov D. A. <sup>2</sup>, Yudina T. P. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Moscow state University of food production, Moscow, Russia 125315, Moscow, Volokolamsk highway, d. 11  
e-mail: DemidonaTI@mgupp.ru

<sup>2</sup> Moscow state medico-stomatological University. A. I. Evdokimov, Moscow, Russia, 127473, Moscow, Delegate-skaya str., 20, p. 1

The effectiveness of enteral therapy with the use of specialized instant composite mixture showed the analysis of structural changes in the mucous membranes of the gastrointestinal tract in the group of patients with intestinal insufficiency syndrome.

**Key words:** intestinal failure syndrome, immunoprotective effect, pathogenetic principle of "vicious circle" development.

Intestinal insufficiency syndrome is accompanied by portal toxemia and bacteremia [3], which exacerbates the severity of endogenous intoxication. Therefore, in the complex therapy of the important place occupied by the different methods of sorption detoxication [1, 2].

The study of the effect of specialized instant composite mixture (SICM) on the mucous membrane of the

gastrointestinal tract was carried out in surgical patients with intestinal failure syndrome

In our study, we used SICM obtained on the basis of pectin-containing extracts of secondary raw materials (0.7-1.0% pectin) and freeze-dried sour milk product with probiotic properties and the ability of microflora to synthesize vitamin C and B vitamins (B6, B12).

In clinical conditions, SICM was used through a nasointestinal probe with a course of 5-7 days.

Biopsies of the mucous membrane of the stomach, jejunum and sigmoid colon were studied in two groups of patients with ten people of the paired sample with peritonitis of various etiologies, which was complicated by intestinal insufficiency syndrome (IIS).

In the 1st group, traditional treatment was performed, in the 2nd group, enteral SICM was additionally used.

Biopsy in all patients was performed on the 7th day of treatment.

In the 1st group of patients the histological pattern of gastrobiopsies consistent with chronic gastritis in a stage of aggravation - the 2nd degree of activity (Fig. 1). The morphological pattern in the mucous membranes of the stomach, jejunum and colon confirms a pathogenetic principle for the development of the "vicious circle" in IIS when the pathology in one of the departments of the wall of the digestive system leads to damage in General.

In the 2nd group, where in the complex treatment included enteral therapy SICM, histological changes of the mucous membranes of the stomach, jejunum and Sigma prominent gut differs significantly from that of the previous group (Fig. 2)

In the mucous membrane of the jejunum there were slight changes. Immunoprotective effect of SICM was determined by the presence of lymphoid follicles. Under the influence of SICM in the mucous membrane of the colon, there was no destructive processes and increased proliferation, especially the epithelium of intestinal crypts.

Morphological manifestations of a more favorable treatment effect are reflected in the chronization of the inflammatory process without manifestations of exacerbation.

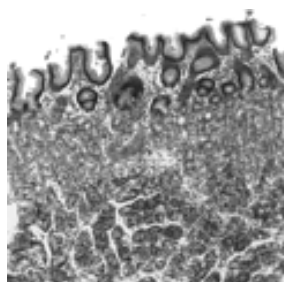


Figure 1.

The morphology of the mucosa of the gastric mucosa in the treatment without SICM

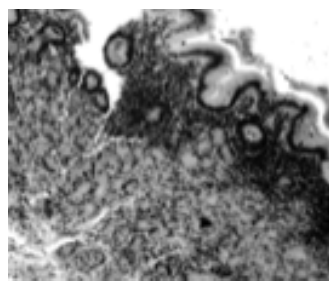


Figure 2.

The morphology of the mucosa of the gastric mucosa in the treatment of SICM

#### References:

1. Vatazin A. V., Lobanov A. I., Fomin A. M. Hemofiltration in the syndrome of multiple organ failure in patients with peritonitis. M., "M-Oko", 1997, 140 p.
2. Gelfand B. R., Matveev D. V., Sergeeva N. Ah. and other Role of portal bacteremia and endotoxemia in the pathogenesis of multiorgan failure in peritonitis. Surgery, 1992, no. 1, pp. 21-27.
3. Popova T. S., Tamazashvili T. sh., Shestopalov A. E. Syndrome of intestinal failure in surgery. M., Medicine, 1991, 240 p.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77

## ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ЛИПИДАМИ

Чеботарёв С. А. <sup>1</sup>, Гуреева М. Д. <sup>1</sup>, Ганзориг Г. <sup>1</sup>, Ульянов Д. С. <sup>1</sup>, Хурумова А. А. <sup>1</sup>, Зеликина Д. В. <sup>2</sup>, Антипова А.С. <sup>2</sup>, Мартиросова Е. И. <sup>2</sup>, Медведева И. Б. <sup>2</sup>, Семёнова М.Г. <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия. 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4, E-mail: sportsislive@gmail.com

Изучено влияние хитозана на структуру и функциональные свойства комплексов изолята сывороточных белков молока (ИСБ) с комбинацией биологически активных липидов (липосом фосфатидилхолина (ФХ),



наполненных незаменимой (омега-3) альфа-линоленовой жирной кислотой (АЛК)).

**Ключевые слова:** полиненасыщенные жирные кислоты, хитозан, изолят сывороточных белков молока, функциональные свойства, структурные параметры

По данным количественной оценки образования первичных (гидроперекисей) и вторичных (кетодиенов и малонового диальдегида (МДА)) продуктов автоокисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), свободных и инкапсулированных биополимерами (изолятом сывороточных белков (ИСБ) молока и хитозаном), было установлено, что максимальной защитной способностью обладают комплексы, содержащие избыточное по отношению к хитозану весовое количество ИСБ (9 : 1). Методом лазерного многоугольного светорассеяния охарактеризованы структурные (молярная масса, размер, архитектура, плотность) и термодинамические параметры (термодинамическое сродство к растворителю) таких комплексов и выявлены основные взаимосвязи между этими параметрами и функциональностью комплексов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

UDK 544.3.03: 544.032: 544.77

## IMPACT OF CHITOSAN ON THE STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE COMPLEXES OF WHEY PROTEIN ISOLATE WITH BIOLOGICALLY ACTIVE LIPIDS

**Chebotarev S. A. <sup>1</sup>, Gureeva M. D. <sup>1</sup>, Ganzorig G. <sup>1</sup>, Ulyanov D.S. <sup>1</sup>, Hurumova A.A. <sup>1</sup>, Zelikina D. V. <sup>2</sup>, Antipova A. S. <sup>2</sup>, Martirosova E. I. <sup>2</sup>, Medvedeva I. B. <sup>2</sup>, Semenova M. G. <sup>2</sup>**

<sup>1</sup> D. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia  
125047 Moscow, Miusskaya sq., 9

<sup>2</sup> N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
119334 Moscow, Kosygin str., 4, E-mail: sportsislive@gmail.com

The impact of chitosan has been studied on the structure and functional properties of the complexes of whey protein isolate (WPI) with a combination of the biologically active lipids (phosphatidylcholine (PC) enriched by the essential (omega-3)  $\alpha$ -linolenic acid (ALA)).

**Key words:** polyunsaturated fatty acids, chitosan, whey protein isolate, functional properties, structural parameters

The conducted quantitative measurements of the primary (dienoic hydroperoxides) and secondary (cetodiens and malonic dialdehyde) products of the autooxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), both encapsulated by biopolymers and free, have shown that the complexes, having in the excess of WPI over chitosan (9 : 1), possess the maximal protective ability against oxidation of the lipids. Using multiangle laser light scattering, we have characterized both structural (molar mass, size, architecture, density) and thermodynamic (thermodynamic affinity for solvent) parameters of such complexes. The basic relationships between these parameters and the functional properties of the complexes have been revealed.

This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 18-316-00111.

УДК 613.2:57.088.1: 577.29

## ГМ КАРТОФЕЛЬ ЛИНИИ EN92-527-1: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Садыкова Э.О. <sup>1</sup>, Тышко Н. В. <sup>1</sup>, Сухачева М.В. <sup>2</sup>, Батулин А.К. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия  
109240, Москва, Устьинский проезд, дом 2/14  
e-mail: seo@ion.ru

Подтверждена возможность обеспечения эффективного надзора за обращением генно-инженерно-модифицированного (ГМ) картофеля линии EN92-527-1 в Российской Федерации. Праймерные системы для выявления трансформационного события EN92-527-1 характеризуются высокой степенью специфичности.

**Ключевые слова:** ГМ картофель; полимеразная цепная реакция (ПЦР); методы выявления ГМО; трансформационное событие.

В данной работе представлены аналитические характеристики ПЦР-метода, применяемого для идентификации и количественного определения ГМ картофеля линии EN92-527-1 в пищевой продукции.

Результаты BLAST-проверки теоретической специфичности праймеров и зондов для идентификации трансформационного события EN92-527-1 показали, что каждая из пар праймеров характеризуется высоким уровнем гомологии, то есть, подтверждена их полная идентичность с ожидаемыми целевыми последовательностями.

Определение количества ГМ картофеля линии EN92-527-1 в образцах проводили с помощью калибровочной кривой, для построения которой использовали стандарты (ERM-BF421), представляющие собой контрольные растворы с известным содержанием ДНК картофеля. Приготовленные образцы анализировали с помощью двух праймерных систем, специфичных к нуклеотидной последовательности целевого гена и к трансформационному событию. Первая точка калибровочной кривой соответствовала содержанию ГМ компонента 10% в 100 нг суммарной ДНК картофеля. При приготовлении остальных (5%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%) стандартов использовали последовательные разведения 10% стандарта. Показано, что углы наклонов стандартных кривых во всех случаях лежали в интервале от -3,6 до -3,1, а коэффициенты корреляции, рассчитанные методом линейной регрессии ( $R^2$ ), превышали 0,98.

В дальнейших исследованиях были подтверждены эффективность, линейность и правильность реакций. Эффективность амплификации для трансформационного события EN92-527-1 составляла 91,2%, что соответствовало допустимому диапазону от 90% до 110%; пределы обнаружения и количественного обнаружения составляли 0,036% (20 копий) и 0,1% (56 копий), из расчета на 100 нг суммарной ДНК при  $RSDr \leq 25\%$ .

На основании проведенных исследований было показано, что праймерные системы для выявления трансформационного события EN92-527-1 характеризуются высокой специфичностью, возможность возникновения ложноположительных сигналов признана маловероятной. Таким образом, аналитические характеристики ПЦР-метода, применяемого для идентификации и количественного определения ГМ картофеля линии EN92-527-1, позволят обеспечить эффективный контроль за данным ГМО в Российской Федерации.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-16-04123.

UDC 613.2:57.088.1: 577.29

## GM POTATO LINE EH92-527-1: THE IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION

Sadykova E.O. <sup>1</sup>, Tyshko N. V. <sup>1</sup>, Suhacheva M.V. <sup>2</sup>, Baturin A.K. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Institution of Science «Federal Research Centre of nutrition, biotechnology and food safety», Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences», Moscow, Russia  
109240 Moscow, Ustinsky Proezd, 2/14  
e-mail: seo@ion.ru

The possibility of effective control over the genetically modified (GM) potato line EH92-527-1 circulation in the Russian Federation was confirmed. Primer systems for detection of transformation event EH92-527-1 are characterized with a high degree of specificity.

**Key words:** GM potatoes; polymerase chain reaction (PCR); methods for detection of GMO; the transformation event.

The analytical characteristics of PCR method for identification and quantification of GM potato line EH92-527-1 in food are presented in the publication. The results of BLAST-test of primers and probes theoretical specificity for transformation event EH92-527-1 identification has shown a high level of each pair primers homology. Thus, the primers full identity to the expected target sequences was confirmed.

Detection of GM potato line EH92-527-1 amount in the test samples was carried out by comparing to the calibration curve. For the curve plotting were used the reference materials (ERM-BF421) with known DNA content of GM potato. The test samples were analyzed with two primer systems that are specific to the target gene's and transformation event's nucleotide sequences. The first point of the calibration curve was corresponded to the standard with 10% content of the GM component per 100 ng of total potato DNA. The standards with lower contents of recombinant DNA (5%, 2%, 1%, 0.5%, and 0.1%) were prepared by gradual dilutions of 10% standard. It was shown that the standard curve slopes in all cases laid in the range from -3.6 to -3.1, and the correlation coefficients, calculated by linear regression method ( $R^2$ ), exceeded 0.98.

Effectiveness, linearity and trueness of the reactions have been confirmed in further studies. The amplification efficiency for the event EN92-527-1 was 91.2%, corresponding to the permissible range from 90% to 110%, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.036% (20 copies) and 0.1% (56 copies) respectively, based on 100 ng total DNA at  $RSDr \leq 25\%$ .

The research results proved a high degree of studied primer systems specificity, the possibility of false positive results is considered improbable. Thus, the analytical characteristics of PCR method of GM potato EH92-527-1 detection and quantification will allow to provide the effective control over this GM line in the Russian Federation.

This work was supported by Russian science Foundation grant No. 16-16-04123.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77

## ЗАЩИТНЫЕ СПОСОБНОСТИ ИЗОЛЯТА СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА ПО ОТНОШЕНИЮ К ИНКАПСУЛИРОВАННОЙ ИМ ЭКВИМАССОВОЙ КОМБИНАЦИИ НЕЗАМЕНИМЫХ ОМЕГА-3 И ОМЕГА-6 ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Ульянов Д.С. <sup>1</sup>, Хурумова А.А., Ганзориг Г. <sup>1</sup>, Чеботарёв С.Д., <sup>1</sup> Гуреева М.Д. <sup>1</sup>, Зеликина Д. В. <sup>2</sup>, Антипова А.С. <sup>2</sup>, Мартиросова Е. И. <sup>2</sup>, Медведева И. Б. <sup>2</sup>, Семёнова М.Г. <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия.  
125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия  
119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4, E-mail: uldas1508@gmail.com

Изучены защитные способности изолята сывороточных белков молока (ИСБ) по отношению к окислению эквивалентной комбинации омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот (обеспеченной липосомами фосфатидилхолина (ФХ), наполненными незаменимой (омега-3) альфа-линоленовой жирной кислотой (АЛК)) в их супрамолекулярном комплексе.

**Ключевые слова:** полиненасыщенные жирные кислоты, изолят сывороточных белков молока, защита от окисления, структурные параметры

В нашей работе мы провели изучение защитных способностей ИСБ по отношению к инкапсулированной им комбинации легко окисляемых биологически активных липидов (ФХ + АЛК). Было установлено, что как нативная, так и частично денатурированные (60°C 10 мин; 70°C 10 мин) формы ИСБ показывают высокий уровень защиты от окисления изученной комбинации липидов (- 85%). При этом частично денатурированные формы ИСБ обладали большими защитными способностями. Для выяснения ключевых структурных факторов, лежащих в основе этих способностей, была проведена детальная характеристика молекулярных параметров комплексов ИСБ с липидами методами дифференциально-сканирующей калориметрии и лазерного многоугольного светорассеяния. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

UDC 544.3.03: 544.032: 544.77

## PROTECTIVE ABILITY OF WEY PROTEIN ISOLATE RELATIVE TO THE ENCAPSULATED BY IT EQUIMASS COMBINATIONS OF OMEGA-3 AND OMEGA-6 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

Ulyanov D.S. <sup>1</sup>, Hurumova A.A. <sup>1</sup>, Ganzorig G. <sup>1</sup>, Chebotarev S. A. <sup>1</sup>, Gureeva M. D. <sup>1</sup>, Zelikina D. V. <sup>2</sup>, Antipova A. S. <sup>2</sup>, Martirosova E. I. <sup>2</sup>, Medvedeva I. B. <sup>2</sup>, Semenova M. G. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> D. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia  
125047 Moscow, Miuskaya sq., 9

<sup>2</sup> N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
119334 Moscow, Kosygin str., 4, E-mail: uldas1508@gmail.com

The protective ability of the whey protein isolate (WPI) against oxidation of the encapsulated by it equimass combinations of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (provided by liposomes of phosphatidylcholine (PC), enriched by essential omega-3 alpha - linolenic acid (ALA)) in their supramolecular complex.

**Key words:** polyunsaturated fatty acids, whey protein isolate, protection against oxidation, structural parameters

In our work we have studied the protective ability of the whey protein isolate (WPI) against oxidation of the encapsulated by it combination of easy oxidative biologically active lipids (PC + ALA). It was found that both the native and the partly denatured (60°C 10 min; 70°C 10 min) forms WPI have shown the great protection against oxidation (- 85%) given to the studied combination of the lipids. As this took place, the partly heat denatured WPI forms demonstrated the higher protective ability. In order to elucidate the key structural factors underlying these protective abilities the characterization in detail of the molecular parameters of the WPI-lipids complexes was performed using the differential scanning calorimetry and the multiangle laser light scattering. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 18-316-00111.

УДК: 577.112:577.15

## ИЗУЧЕНИЕ БИОКОНВЕРСИИ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ И ЖИВОТНОЙ ПРИРОДЫ

А.Г.Ахремко

ФГБНУ "ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН, Россия, 109316, Москва, Талалихина, 26, ahremko94@gmail.com, +79152379497

С помощью протеомных методов определены продукты биоконверсии белков мышечной ткани *Bos Taurus* после воздействия протеаз, растительного и животного происхождения, и предложена перспектива их применения.

**Ключевые слова:** пептиды, протеазы, *Bos Taurus*, мышечные белки, двумерный электрофорез

Мясные белки обладают огромным потенциалом в качестве новых источников биологически активных веществ различного действия. В настоящее время из мясного сырья выделяют большое количество биологически активных веществ – полипептидов и коротких пептидов. Полипептиды участвуют в механизмах пара- и аутокринной регуляции функций макроорганизма и выполняют функции внутри- и межклеточных мессенджеров. Короткие пептиды обладают полифункциональным действием: в организме они принимают участие в процессе переноса информации между клетками, регулируют их активность.

Многочисленными исследованиями показано, что при воздействии на мясное сырье протеазами и пептидазами животного, растительного и микробного происхождения образуется широкий спектр соединений, обладающих антимикробными, иммуномодулирующими, опиоидными, антитромботическими, гипотоническими, антиоксидантными, минерал-связывающими и холестерин-снижающими свойствами [1].

На базе ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН проводится широкий спектр исследований, направленных на выделение и изучение веществ белковой природы из сырья животного происхождения, обладающих биологической активностью, для создания функциональных продуктов и ингредиентов направленного действия.

Целью данного исследования являлось получение информации о трансформации и механизмах деградации белков говядины, обработанной протеолитическими ферментами растительного и животного происхождения с помощью протеомных методов.

В качестве объекта исследования была использована мышечная ткань *L. dorsi Bos Taurus*; в качестве протеаз использовали монопрепараты – полипептид папаина (1,1 U/mg solid), гликопротеид бромелайна (2370 U/g prot.), пепсин (2000 U/g) и трипсин (10000 NFU/mg), а также комплексную смесь «Фестал» (амилаза 4500 FIP ЕД, липаза 6000 FIP ЕД, протеаза 300 FIP ЕД, желчь, гемицеллюлоза). Протеазы вводили в мясное сырье путем шприцевания в виде 1,5 % водных растворов, сырье, обработанное трипсином и пепсином выдерживали в течение 40 мин при 30 °С, обработанное папаином, бромелайном и «Фесталом» – 30 мин при 30 °С.

Биоконверсию мышечных белков анализировали методом двумерного электрофореза по О'Фарреллу с изоэлектрофокусированием в амфолиновом градиенте с использованием камеры PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad, США), посредством оценки количественного содержания белков на 2D-электрофореграммах (2ДЭ) с помощью компьютерной денситометрии с использованием сканера Bio-5000 plus (Serva, Германия) [2].

Установлено, что при деструкции высокомолекулярных мышечных белков, в том числе протеазами, могут образовываться помимо промежуточных веществ значительные количества полипептидов и коротких пептидов, несущие совершенно иные и более выраженные биологические функции по сравнению с исходной макромолекулой. В настоящее время изучено большое количество полипептидных веществ и коротких пептидов, выделенных из мясного сырья, нативно присутствующих в нем или образующихся под воздействием различных ферментов.

В настоящем исследовании было выявлено, что использование растительных протеаз приводит к выраженной деструкции мышечных белков. При обработке папаином отмечено исчезновение традиционно идентифицируемых мышечных белков *Bos Taurus* (тропомиозины, тропонины, актинин, миоальбумин, мышечная креатинкиназа), детектировались фрагменты разных типов тяжелых цепей миозина (MYH1, 2 и 7), локализованные в мышечных волокнах быстрого и медленного типа, при этом миоглобин упрощался на крупные дискретные пятна, отсекая последовательно N и C-концевые части молекулы [2, 3]. При обработке бромелайном детектировались в остаточном количестве фракции α- и β-тропомиозинов, появлялись дополнительные наборы белковых фракций с массой менее 170 кДа из актомиозинового комплекса, фракции фрагментов MYH7 не обнаруживались, что говорит о частичной деструкции мышечных белков до более коротких фрагментов.

При воздействии животными протеазами на мышечную ткань показано образование ряда промежуточных фрагментов в виде фракций от ранее идентифицированных мажорных мышечных белков (мышечная креатинфосфокиназа, альдолаза А, митохондриальная аконитаза и пр.). Детектировались фрагменты C-конца тяжелой цепи миозина, которые в норме агрегирующей на старте геля, что свидетельствует об изменениях в актомиозиновом комплексе. Особое внимание привлек белок в щелочной зоне геля, при идентификации фрагментов которого выявлено, что это белок 1 изоформа 2, содержащий четыре с половиной LIM домена. При этом наблюдаемая масса этого белка значительно шире по диапазону, чем традиционная аминокислотная последовательность (не более 32 кДа). В связи с чем сделан вывод о том, что после протеолиза данный белок сохраняет свою коровую часть (позиции 60-278) и образует разные агрегаты.

При использовании «Фестала» отмечалась максимальная утилизация мышечных белков, наиболее представленные на 2ДЭ по количеству фракции - мышечная креатинфосфокиназа, мышечная енолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, альдолаза А, α- и β-тропомиозины, легкие цепи миозина 1/3 и 2 и

др. с общим явным уменьшением в количестве, за исключением миоглобина.

Таким образом, в результате эксперимента выявлено, что деструкция структурных мышечных белков с образованием их иных изоформ при обработке протеазами животного и растительного происхождения, зависит как от специфичности выбранного фермента, так и от белков-предшественников.

Исследование действия протеолитических ферментов на белки мышечной ткани *Bos Taurus* позволили выявить различный характер действия растительных и животных протеаз. При этом наибольшей степенью выраженности действия обладал препарат «Фестал», содержащий как животные протеазы, так и растительную. Установлена деструктуризация широкого спектра мышечных белков до более коротких фрагментов, в особенности белков актомиозинового комплекса, тропомиозинов, енолазы и пр. Полученные соединения могут рассматриваться как потенциальные источники биологически активных пептидов. Так, проведенные ранее исследования показали возможность получения пептидов, обладающих гипотензивными и холестеринснижающими действиями, при расщеплении миозина, тропонина, титина и актина мышечной ткани [3]. Возможность применения биотехнологических методов модификации мясного сырья в мясоперерабатывающей отрасли позволит расширить ассортимент продуктов с заданными свойствами, в том числе специализированных и функциональных продуктов на основе белково-пептидных комплексов, обладающих выраженной биологической активностью. В дальнейшем планируется более детально изучить спектр функциональных пептидов и определить их биологическую активность.

#### Литература:

- 1 Chernukha I.M., Fedulova L.V., Kotenkova E.A., Takeda S., Sakata R. Hypolipidemic and anti-inflammatory effects of aorta and heart tissues of cattle and pigs in the atherosclerosis rat model // *Animal Science Journal*. – 2018. – P. 1-10. doi:10.1111/asj.12986 2) Vostrikova N.L., Kulikovskii A.V., Chernukha I.M., Kovalev L.I., Savchuk S.A. Determination of Muscular Tissue Proteins by 2D Electrophoresis and Time-of-Flight Mass Spectrometry // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2017. - V. 72. - №10. – P. 1102–1112. doi: 10.1134/S1061934817100173 3) Zvereva A.E., Kovalev L.I., Ivanov A.V., Kovaleva M.A., Zherdev A.V., Shishkin S.S., Lisitsyn A.B., Chernukha I.M., Dzantiev B.B. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products // *Meat Science*. – 2015. - V. 105. – P. 46–52.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-10073)

UDC 577.112:577.15

## PROTEOLYTIC PLANT AND ANIMAL ORIGIN ENZYMES INFLUENCE ON MUSCLE PROTEINS BIOCONVERSION

A.Akhremko

V.M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Russia, 109316, Moscow, Talalikhina, 26

Proteins bioconversion in muscle tissue treatment by *Bos Taurus* with proteolytic plant and animal enzymes is considered. With protein methods, protein fractions exposed to proteases are identified.

**Key words:** peptides, protease, *Bos Taurus*, muscle proteins, two-dimensional electrophoresis

Numerous biotechnology studies for obtaining new food products are aimed at increasing their ultimate biological value. One of the ways to increase it can be specific proteases use to protein substrates that ensure proteins bioconversion and their deep destruction [1].

Aim of this study was to obtain information on the transformation L. dorsi *Bos Taurus*, proteins treated with plant and animal origin proteolytic enzymes using proteomic methods.

Papain polypeptide and high molecular weight bromelain glycoprotein use as proteolytic plant enzymes is due to their low specificity, as well as pH action optimum from 5 to 7.5, which is close to conditions that are observed in muscle tissue. Pepsin hydrolasa, cleaving central peptide bonds in protein and peptide molecules (except for keratin and other scleroproteins), and trypsin hydrolasa, which cleaves peptides and proteins, were chosen as animal origin protease. These proteases have catalytic activity optimum at pH from 7.8 to 8.0 and at temperature 37-40 ° C. As a complex mixture was used pharmaceutical preparation "Festal" (Sanofi Aventis, India), containing components as an animal (amylase 4500 FIP ED, lipase 6000 FIP ED, protease 300 FIP ED, bile), and plant (hemicellulose) origin. The described proteases were introduced into meat raw materials in 1.5% aqueous solutions form by extrusion.

Then raw meat was aged for 40 min at 30°C for trypsin and pepsin preparations, 30 min for papain, bromelain and Festal. Two-dimensional O'Farrell electrophoresis with isoelectrofocusing in ampholin (IEF-PAGE) was used as the main proteomic technology.

Papain and bromelain pronounced effect on *L. dorsi* *Bos Taurus* has been established, while papain treatment leads to *Bos Taurus* previously identified muscle proteins disappearance. Fragments of myosin heavy chains different types (MYH1, 2 and 7), localized in fast and slow type muscle fibers, were detected, and myoglobin was simplified to large discrete spots, cutting off successively the N- and C-terminal parts of the molecule [2, 3].

In the treatment with bromelain, the  $\alpha$ - and  $\beta$ -tropomyosins fractions were detected in residual amount, myoglobin remained practically intact. Protein fractions additional sets appearance with a mass lower than 170 kD from the actomyosin complex was observed, MYH7 fragments fractions were not detected. Thus, bromelain proved to be more universal preparation for short peptides formation.

Proteins quantitative content analysis on 2D electrophoregram (2DE) using *Bos Taurus* muscle tissue samples computer densitometry under animal proteases influence showed number of intermediate fragments formation in fractions form from major proteins (muscle creatine phosphokinase, aldolase A, mitochondrial aconitase, etc., ). Myosin heavy chain C-terminus fragments (normally aggregating at IEF gel start) were detected, which indicates ongoing proteolytic changes in the actomyosin complex.

Particular attention was drawn to presence in protein alkaline zone, which fragments identification revealed that this fraction is protein 1 isoform 2 containing four and a half LIM domains. This protein observed mass is much wider in range than the traditional amino acid sequence (not more than 32 kDa). In this connection, it was concluded that with proteolytic treatment this protein retains its core part (positions 60-278) and forms various aggregates.

"Festal" effect on *Bos Taurus* skeletal muscles was characterized by the maximum activity in muscle proteins utilization, with the most represented by the number of fractions - muscle creatine phosphokinase, muscle enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase A,  $\alpha$ - and  $\beta$ -tropomyosins, chains of myosin 1/3 and 2, myoglobin, etc. with a general apparent decrease in the amount, with myoglobin exception.

In this paper, various proteolytic enzymes effect on *Bos Taurus* muscle tissue proteins was investigated. The most pronounced effect was possessed by "Festal". Obtained data can be used in meat product development whose significant structural changes will increase protein substances lability for digestive enzymes action.

#### References:

- 1 Chernukha I.M., Fedulova L.V., Kotenkova E.A., Takeda S., Sakata R. Hypolipidemic and anti-inflammatory effects of aorta and heart tissues of cattle and pigs in the atherosclerosis rat model // *Animal Science Journal*. – 2018. – P. 1-10. doi:10.1111/asj.12986 2) Vostrikova N.L., Kulikovskii A.V., Chernukha I.M., Kovalev L.I., Savchuk S.A. Determination of Muscular Tissue Proteins by 2D Electrophoresis and Time-of-Flight Mass Spectrometry // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2017. - V. 72. - №10. – P. 1102–1112. doi: 10.1134/S1061934817100173 3) Zvereva A.E., Kovalev L.I., Ivanov A.V., Kovaleva M.A., Zherdev A.V., Shishkin S.S., Lisitsyn A.B., Chernukha I.M., Dzantiev B.B. Enzyme immunoassay and proteomic characterization of troponin I as a marker of mammalian muscle compounds in raw meat and some meat products // *Meat Science*. – 2015. - V. 105. – P. 46–52.

**Grant:** This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 16-16-10073).

УДК 579.678

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ LACTOCOCCUS LACTIS K-205 ДЛЯ ПРОДЛЕНИЯ СРОКА ХРАНЕНИЯ ОХЛАЖДЕННОГО МЯСА

Сультимова Т. Д. <sup>1</sup>, Стоянова Л. Г. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления, Улан-Удэ, Россия  
670013, Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в  
e-mail: tsultimova@mail.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет, Москва, Россия  
119234, Москва, Ленинские Горы, 1

Изучены антимикробные свойства и возможность использования молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* K-205 в качестве биоконсерванта. Показано, что в результате обработки культурой поверхности образцов охлажденного мяса, выявлены лучшие результаты по сравнению с контролем и, соответственно, более длительный срок хранения.

**Ключевые слова:** *Lactococcus lactis*, бактериоцин, биоконсервант

Как альтернатива традиционным химическим консервантам, бактериоцины или бактериоцинпродуцирующие бактерии являются перспективными и могут использоваться для контроля присутствия патогенных микроорганизмов, например, *L. monocytogenes*. В данной работе охлажденное мясо (d=5-7 см) обрабатывали активной бактериоцинпродуцирующей культурой *Lactococcus lactis* K-205, выделенной из национального кисломолочного напитка курунга и хранили в условиях холодильника при температуре 3-5°C в течение 10 суток. В качестве контроля использовали необработанный культурой лактококка образец.

Все образцы охлажденного мяса проверяли на соответствие СанПиН 2.3.2.1078-01 по микробиологическим показателям.

В результате выявлено, что показатель КМАФАМ в контрольном образце намного превышает опытные значения и значения СанПиН на 10 сутки хранения, что, свидетельствует об антибиотическом действии культуры *Lactococcus lactis* K-205.

#### Литература:

1 Morisset D. *Mutational analysis of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin, for determination of impact on bactericidal activity, in vitro secondary structure, and membrane interaction // Appl. Environ. Microbiol.* 2004. Vol. 2. P. 4672-4680.

2 Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Нетрусов А.И. Создание банка лиофильных бактериоцинпродуцирующих молочнокислых бактерий // *Цитология*. – 2004. – Т. 46. – №10. – С.865-867.

3 Chan Li, Jinghua Baib, Zhaoling Caia, Fan Ouyanga. *Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by Lactococcus lactis using response surface methodology // Journal of Biotechnology.* 2002. Vol. 93. Issue 1. P. 27-34.

4 Shima J. *Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by ther-mophilic enterococci: Enterococcus faecalis K-4 // Biosci. Biotechn. Biochem.* 2001. Vol. 2. P. 247-253.

5 Farias M. E. *Letters in Purification and N-terminal acid sequence of enterocin-CRL35, a pediocin-like bacteriocin produced by Enterococcus faecium CRL35 // Appl. Microbiol.* 2004. Vol. 4. P. 417-419.

UDC 579.678

## INVESTIGATION OF THE STRAIN LACTOCOCCUS LACTIS K-205 FOR EXTENSION OF THE LIMITED STORE OF COOLED MEAT

T.D. Sultimova <sup>1</sup>, L.G. Stoyanova <sup>2</sup>

<sup>1</sup> East Siberia State University of Technology and Management, Ulan-Ude, Russia  
40V Klyuchevskaya ul., Ulan-Ude, Russia, 670013  
e-mail: tsultimova@mail.ru

<sup>2</sup> Lomonosov's Moscow State University, Moscow, Russia  
1 Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119234

Antimicrobial properties and the possibility of using lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* K-205 as a biopreservative have been studied. It is shown that as a result of surface treatment of samples of cooled meat, the best results are revealed in comparison with the control and, consequently, a longer shelf life.

**Key words:** *Lactococcus lactis*, bacteriocin, biopreservative

As an alternative to traditional chemical preservatives, bacteriocins or bacteriocin producing bacteria are promising and can be used to control the presence of pathogenic microorganisms, for example, *L. monocytogenes*. In this work, the cooled meat (d = 5-7 cm) was treated with the active bacteriocin producing culture *Lactococcus lactis* K-205, isolated from the national fermented milk drink of Kurunga and stored in a refrigerator at a temperature of 3-5°C for 10 days. As a control, an untreated sample of the lactococcus was used.

All samples of cooled meat were checked for compliance with SanPiN 2.3.2.1078-01 according to microbiological indices.

As a result, it was revealed that the total number of microorganisms in the control sample far exceeds the experimental values and the values of SanPiN on the 10th day of storage, which indicates the antibiotic action of the culture of *Lactococcus lactis* K-205.

#### References:

1. Morisset D. *Mutational analysis of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin, for determination of impact on bactericidal activity, in vitro secondary structure, and membrane interaction // Appl. Environ. Microbiol.* 2004. Vol. 2. P.



4672-4680.

2. Stoyanova L.G., Sultimova T.D., Netrusov A.I. Creation of a bank of lyophilic bacteriocin-producing lactic acid bacteria // *Cytology*. - 2004. - Т. 46. - № 10. - P. 865-867.

3. Chan Li, Jinghua Baib, Zhaoling Caia, Fan Ouyanga. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology // *Journal of Biotechnology*. 2002. Vol. 93. Issue 1. P. 27-34.

4. Shima J. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci: *Enterococcus faecalis* K-4 // *Biosci. Biotechn. Biochem.* 2001. Vol. 2. P. 247-253.

5. Farias M. E. Letters in Purification and N-terminal acid sequence of enterocin-CRL35, a pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* CRL35 // *Appl. Microbiol.* 2004. Vol. 4. P. 417-419.

УДК 57.085.23

## ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭЛИСИТОРА МЕТИЛЖАСМОНАТА НА РОСТОВЫЕ И БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ PANAX GINSENG C.A. MEYER

Филимонова В.В., Константинова Н.А., Фоменко И.А., Раздина И.И.

ОАО «Институт прикладной биохимии и машиностроения «Биохиммаш», Москва, Россия  
127299, Москва, ул. Клары Цеткин, д. 4  
e-mail: victoria-96@bk.ru

Проведена разработка способа увеличения биосинтетических показателей суспензионной культуры *Panax ginseng* C.A. Meyer с помощью добавления в питательную среду элиситора метилжасмоната.

**Ключевые слова:** гинзенозиды, *Panax ginseng*, культура клеток, биомасса, метилжасмонат.

В мире многие лекарственные средства, пищевые добавки и другие ценные вещества получают из природного растительного сырья, в настоящее время проявляется особый интерес к гинзенозидам (вторичным метаболитам женьшеня).

Женьшень настоящий (*Panax ginseng* C.A. Meyer) – лекарственное растение долголетия, препараты на его основе издавна применяются в качестве тонизирующих и адаптогенных средств при умственном и физическом переутомлении, нервных, сердечно-сосудистых и других заболеваниях [1]. Количество растений рода *Panax* в природе ограничено, в связи с этим широко исследуется возможность получения гинзенозидов биотехнологическим путем, используя культуру *in vitro*. Однако, как правило, клеточные культуры уступают интактному растению по содержанию ценных метаболитов или продуцируют их в количестве, недостаточном для экономической эффективности производства. Поэтому наличие высокопродуктивных штаммов – одна из важнейших задач для создания технологий на основе клеток растений. В последнее время для увеличения биосинтетической способности клеток растений широко используют метод элиситации [2].

Целью данной работы являлась разработка способа увеличения биосинтеза гинзенозидов в культуре растительных клеток *Panax ginseng* штамма, полученного в ОАО «Биохиммаш» методом селекции. Данный штамм депонирован в коллекцию культур клеток ВКПМ. ВКПМ является членом Всемирной Федерации коллекций культур (WFCC). Суспензионную культуру женьшеня выращивали на качалочных колбах на модифицированной среде Мурасиге-Скуга, с периодическими пересевами через 14 суток, рост культуры определяли по накоплению сырой и сухой биомассы, качественный и количественный состав гинзенозидов определяли методом ВЭЖХ.

Исследование исходного штамма показало, что клетки обладают удовлетворительным ростом и синтезируют основные семь гинзенозидов (Rg1, Re, Rf, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rd), которые характерны для корня женьшеня, однако уступают по количественному содержанию гинзенозидов и различаются по их соотношению. Максимального содержания гинзенозидов культура достигает в конце цикла роста в стационарной фазе.

В экспериментах в качестве элиситора использовали метилжасмонат, который вводили в культуру на десятые сутки роста в концентрации 200 мкг/дм<sup>3</sup>, оптимальную дозу элиситора установили опытным путем.

Полученные результаты показали, что контрольные и опытные варианты по накоплению биомассы в конце цикла роста отличаются незначительно. Однако по содержанию гинзенозидов варианты с добавлением метилжасмоната существенно (в 7–10 раз) превосходят контрольные. Качественный состав гинзенозидов сохраняется и соответствует природному корню.

Настоящее исследование имеет большое практическое значение для биотехнологической промышленности, в частности для получения гинзенозидов *in vitro* и их последующего использования в качестве субстанции для фармакологической и пищевой отрасли.

## Литература:

1. Lee CH, Kim JH. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases. *J Ginseng Res.* 2014; 38(3): 161–166.
2. Thanh N.T., Murthy H.N., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y.; Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67 (2): 197 – 201. [PDF]

UDC 57.085.23

## ELICITOR METHYL JASMONATE INFLUENCE ON GROWTH AND BIOSYNTHETIC CHARACTERISTICS OF SUSPENSION CULTURE PANAX GINSENG C.A. MEYER

**Filimonova V.V., Konstantinova N.A., Fomenko I.A., Razdina I.I.**

JSC Institute for Applied Biochemistry and Machine Engineering "Biokhimmash", Moscow, Russia  
127299, Moscow, Klary Tsetkin str., 4  
e-mail: victoria-96@bk.ru

We have developed a method of biosynthetic parameters increase with respect to suspension culture *Panax ginseng* C.A. Meyer by adding methyl jasmonate elicitor to culture media.

**Key words:** ginsenosides, *Panax ginseng*, cell culture, biomass, methyl jasmonate.

In the modern world where a lot of drugs, food additives and other valuable substances are derived from natural plant raw materials, significant interest is given to ginsenosides (ginseng secondary metabolites) these days.

*Panax ginseng* C.A. Meyer is a medicinal plant of longevity, and the drugs on its base have been used as tonic and adaptogenic preparations for management of mental and physical over fatigue, nervous, cardiovascular and other diseases [1]. The amount of *Panax* species is limited in the wild nature; therefore, a possibility of ginsenosides production by biotechnological way, using the cell culture in vitro, is being widely explored. However, as a rule, from the quantitative content of valuable metabolites perspective, cellular cultures are inferior to the intact plant or produce such metabolites in quantity insufficient for economic efficiency of production. Availability of highly productive strains is thus one of the greatest challenges for development of plant cells technologies. Lately, elicitation method has been widely used to increase plant cells biosynthetic capacity [2].

The purpose of the study was to develop a method for increasing ginsenosides biosynthesis in the culture of plant cells *Panax Ginseng* strain obtained in Biokhimmash by selection. The said strain was deposited with Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), which forms a part of World Federation for Culture Collection (WFCC). The ginseng suspension culture was cultivated in shaker glass envelopes on the modified Murashige and Skoog medium, with periodic subculture every 14 days. Cultures growth rate was determined by accumulation of wet and dry biomass, and qualitative and quantitative ginsenosides ratios were defined by HPLC method.

Research of the original strain showed that the cells had a sufficient growth and were able to synthesize seven principal ginsenosides (Rg1, Re, Rf, Rg2, RB1, Rc, RB2, Rd), which are typical for ginseng root. However, cell culture had lower quantitative ginsenosides content and varied in their ratio. The maximum ginsenosides amount in the culture was reached at the end of the growth cycle in the stationary phase.

During the experiments methyl jasmonate was used as an elicitor, which was injected into the culture on the tenth day of growth in a concentration of 200  $\mu\text{m}/\text{dm}^3$ , while the elicitor optimal dosage was established by experiment.

The obtained results showed that the reference and experimental samples of biomass accumulation varied insignificantly at the end of the growth cycle. Samples with the addition of methyl jasmonate, have significantly exceeded (7-10 times) the control samples in terms of ginsenosides quantitative content. The qualitative amount of ginsenosides has been preserved and corresponded to the natural root.

This study has a great practical value for the biotechnology industry, particularly for production of ginsenosides in vitro and their subsequent use as a substance for the pharmacological and food industries.

## References:

1. Lee CH, Kim JH. A review on the medicinal potentials of ginseng and ginsenosides on cardiovascular diseases. *J Ginseng Res.* 2014; 38(3): 161–166.
2. Thanh N.T., Murthy H.N., Yu K.W., Hahn E.J., Paek K.Y.; Methyl jasmonate elicitation enhanced synthesis of ginsenoside by cell suspension cultures of *Panax ginseng* in 5-l balloon type bubble bioreactors. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, 67 (2): 197 – 201. [PDF]

УДК 577.1; 577.1.08

## ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ЭКСПРЕССНОЙ ДЕТЕКЦИИ БЕТА-АГОНИСТОВ В МЯСНЫХ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

**Зверева Е.А., Шпакова Н.А., Еремин С.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: zverevaea@yandex.ru*

Разработаны методы иммуноферментного анализа, иммунохроматографического анализа и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа для детекции бета-агонистов в продуктах питания. Методы апробированы для контроля контаминации мясной и молочной продукции.

**Ключевые слова:** иммунохимические методы анализа, бета-агонисты, продукты питания

Определение содержания бета-агонистов, широко используемых в качестве стимуляторов роста сельскохозяйственных животных и птицы, играет важную роль в контроле качества пищевой продукции. Неконтролируемое поступление соединений этой группы в организм человека с мясными и молочными продуктами может приводить к нарушениям обмена веществ и рискам развития сердечно-сосудистых заболеваний, что обуславливает необходимость разработки методов для экспрессного высокопроизводительного скринингового контроля.

Разработаны новые методы для иммунохимического выявления и контроля содержания бета-агонистов в продуктах питания, основанные на принципах иммуноферментного анализа (ИФА), иммунохроматографического анализа (ИХА) и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) и позволяющие детектировать рактопамин в концентрациях до 0.5-1.0 нг/мл (в зависимости от формата анализа), а сальбутамол – до 0.1-2.0 нг/мл. На примере ИФА сальбутамола показана возможность сокращения суммарной продолжительности анализа до 40-45 мин при сохранении аналитических характеристик. Время детекции с помощью тест-систем, основанных на ИХА и ПФИА, не превышает 15 мин. Охарактеризована селективность используемых в анализе реагентов, ее зависимость от структурных характеристик гаптепов, конъюгируемых с белками-носителями. Показана возможность использования разработанных методов для тестирования молока и мясных продуктов; определены наиболее эффективные способы пробоподготовки. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения разработанных методов для обеспечения безопасности пищевой продукции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Химический анализ и исследование структуры веществ: фундаментальные основы и новые методы».

UDK 577.1; 577.1.08

## IMMUNOCHEMICAL METHODS OF RAPID DETECTION OF BETA-AGONISTS IN MEAT AND DAIRY PRODUCTS

**Zvereva E.A., Shpakova N.A., Eremin S.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  
119071, Moscow, Leninsky prospect, 33  
e-mail: zverevaea@yandex.ru*

Methods of enzyme immunoassay, immunochromatographic analysis and polarization fluorescent immunoassay for the detection of beta-agonists in food products have been developed. The methods have been tested to control the contamination of meat and milk products.

**Key words:** immunochemical methods, beta-agonists, food

Determination of the content of beta-agonists which are widely used as growth promoters in livestock and poultry plays an important role in controlling the quality of food products. An uncontrolled flow of this compound

into the human body with meat and dairy products can lead to metabolic disorders and risks of cardiovascular diseases. In this connection, methods of food control for the presence of beta-agonists are demanded.

New methods for the immunochemical detection and control of beta-agonist content in food products based on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunochromatographic analysis (ICA) and fluorescence polarization immunoassay (PFIA) have been developed. They allow the detection of ractopamine at concentrations of 0.5-1.0 ng/ml (depending on the format of the analysis), and salbutamol - up to 0.1-2.0 ng/ml. The possibility of reduction the total duration of the assay to 40-45 min with maintaining the analytical characteristics was shown on the example of ELISA of salbutamol. The assay duration using test systems based on ICA and PFIA does not exceed 15 minutes. The selectivity of the reagents and its dependence on the structural characteristics of haptenes conjugated to protein carriers was described. The possibility of using the developed methods for testing dairy and meat products was shown. The most effective methods of sample preparation were determined. The results indicate the prospects of application of the developed methods to ensure food safety.

This work was carried out with the financial support of the Program of Fundamental Research of the Presidium of the Russian Academy of Sciences "Chemical analysis and research of the structure of substances: fundamental principles and new methods".

УДК 663.5

## ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В КОНТРОЛЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ ПРОИЗВОДСТВА АЛКОГОЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ

Шелехова Н.В., Поляков В.А., Сербя Е.М., Шелехова Т.М., Веселовская О.В., Скворцова Л.И.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи питания и биотехнологии» (ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»), Москва, Россия, 111033, г. Москва, ул. Самокатная, дом 4б, E-mail: 4953624495@mail.ru

ВНИИПБТ разработан комплекс методик, обеспечивающий оперативный контроль биотехнологических процессов производства спирта и технологических процессов производства спиртных напитков

**Ключевые слова:** инструментальные методы анализа, газовая хроматография, капиллярный электрофорез, хромато-масс-спектрометрия, спирт этиловый ректификованный, спиртные напитки

Роль инструментальных методов в контроле биотехнологических процессов чрезвычайно высока. Многочисленные научные публикации свидетельствуют о возрастающем интересе к хроматографическим методам анализа и внедрению их в аналитическую практику. Сегодня около 60% химических анализов во всех странах мира выполняются методом хроматографии. Очевидны тенденции развития методов капиллярного электрофореза и хромато-масс-спектрометрии. Исследования в этих направлениях позволят в будущем получить новые достижения в развитии науки и применении полученных результатов в различных отраслях народного хозяйства.

Создание новых инструментальных методик для анализа химического состава продуктов и полупродуктов спиртового и ликероводочного производства является сложной аналитической задачей, что связано с многокомпонентностью и многообразием исследуемых сред.

На основании проведенных исследований ВНИИПБТ разработан комплекс аналитических методик с применением методов газовой хроматографии, капиллярного электрофореза и хромато-масс-спектрометрии, позволяющих контролировать ход технологического процесса [1-4].

Разработанные аналитические методики позволяют повысить достоверность результатов, получать новые экспериментальные данные и оперативно контролировать ход технологического процесса. Практическая значимость исследований нашла отражение в промышленности, разработанные аналитические методики внедрены на заводах отрасли.

### Литература:

1 Шелехова, Н.В. Контроль качества алкогольной продукции и биотехнологических процессов переработки сельскохозяйственного сырья в этиловый спирт с использованием хромато-масс-спектрометрических, газохроматографических и электрофоретических методов анализа/Н.В. Шелехова, Т.М. Шелехова, О.В. Веселовская, О.А. Овчинников, Л.И. Скворцова //Производство спирта и ликероводочных изделий. - 2012. - №3. - С.32-34.

2 Шелехова, Н.В. Научное обеспечение контроля биотехнологических процессов производства этилового

спирта /Н.В. Шелехова, Л.В. Римарева, В.А. Поляков//Пиво и напитки. -2016.-№1.-С.16-20.

3 Шелехова, Н.В. Совершенствование системы контроля технологических процессов производства спиртных напитков/ Н.В. Шелехова, В.А. Поляков//Пиво и напитки. -2017. -№1.-С 34-36.

4 Шелехова, Н.В. Применение методов капиллярного электрофореза в контроле качества и безопасности спиртных напитков/Н.В. Шелехова, В.А. Поляков// Хранение и переработка сельхозсырья. -2015.- № 11.- С. 39-42.

UDC 663.5

## INSTRUMENTAL METHODS IN THE CONTROL OF TECHNOLOGICAL PROCESSES OF PRODUCTION OF ALCOHOLIC BEVERAGES

**Shelekhova N. V., Serba E.M., Polyakov V. A., Shelekhova T. M., Veselovskaya O. V., Skvortsova L. I.**

*All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology – a branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia.*

*4b Samokatnaya str., Moscow, 111033, Russia.*

VNIIPBT developed a set of techniques that enable operational control of biotechnological processes production ethyl rectified alcohol and technological processes production alcoholic beverages

**Key words:** instrumental methods of analysis, gas chromatography, capillary electrophoresis, gas mass spectrometry, ethyl rectified alcohol, alcoholic beverages

The role of instrumental methods in the control of biotechnological processes is extremely high. Numerous scientific publications indicate the growing interest in chromatographic methods of analysis and their introduction into an analytical practice.

Today, about 60% of chemical analyses in all countries of the world are performed by chromatography. Obvious trends in the development of methods of capillary electrophoresis and mass spectrometry. Research in these directions will allow in the future to obtain new achievements in the development of science and the application of results achieved in various sectors of the economy. The creation of new instrumental methods for the analysis of the chemical composition of products and intermediates of alcohol and alcoholic beverage production is a complex analytical task that is associated with the complexity and diversity of the studied environments. On the basis of the conducted research VNIIPBT developed a complex of analytical methods using the methods of gas chromatography, capillary electrophoresis and gas chromatography-mass spectrometry that allows to control the progress of the technological process [1-4]. Developed analytical methods allow to increase the reliability of results to new experimental data and efficiently monitor the progress of the process. The practical importance of research is reflected in the industry-developed analytical methods implemented in the factories of the industry.

### References:

1 Shelekhova, N.V. Kontrol' kachestva alkogol'noj produkcii i biotekhnologicheskikh processov pererabotki sel'skohozyajstvennogo syr'ya v ehtilovyyj spirt s ispol'zovaniem hromato-mass-spektrometricheskikh, gazohromatograficheskikh i ehlektroforeticheskikh metodov analiza/N.V. Shelekhova, T.M. Shelekhova, O.V. Veselovskaya, O.A. Ovchinnikov, L.I. Skvortsova //Proizvodstvo spirta i likerovodochnyh izdelij. - 2012. - №3.- S.32-34.

2 Shelekhova, N.V. Nauchnoe obespechenie kontrolya biotekhnologicheskikh processov proizvodstva ehtilovogo spirta /N.V. Shelekhova, L.V. Rimareva, V.A. Polyakov//Pivo i napitki. -2016.-№1.-S.16-20.

3 Shelekhova, N.V. Sovershenstvovanie sistemy kontrolya tekhnologicheskikh processov proizvodstva spirtnyh napitkov/ N.V. Shelekhova, V.A. Polyakov//Pivo i napitki. -2017. -№1.-S 34-36.

4 Shelekhova, N.V. Primenenie metodov kapillyarnogo ehlektroforeza v kontrole kachestva i bezopasnosti spirtnyh napitkov/N.V. Shelekhova, V.A. Polyakov// Hranenie i pererabotka sel'hozsyr'ya. -2015.- № 11.- S. 39-42.

УДК 635.012

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В ОВОЩЕВОДСТВЕ ЗАКРЫТОГО ГРУНТА

Павловская Н.Е., Бородин Д.Б., Гагарина, И.Н., Яковлева И.В.

ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет»  
Орел, Россия  
302019, Орел, ул. Генерала Родина, д.62, кв.29  
e-mail ninel.pavlovsckaya@yandex.ru

Разработан, получен и запатентован биологический пестицид для овощных культур закрытого грунта. Данный препарат увеличивает энергию прорастания, всхожесть, высоту и продуктивность томата, огурца и картофеля. Исследуемый биологический пестицид снижает распространение болезней и повышает урожайность овощных культур.

**Ключевые слова:** биологические пестициды, биопрепараты, закрытый грунт

Успешное развитие овощеводства закрытого грунта в условиях продовольственных санкций и необходимости получения экологически чистой овощеводческой продукции напрямую зависит от создания и внедрения в производство биологических пестицидов и стимуляторов роста, обеспечивающих снижение химической нагрузки и получение высоких урожаев [2]. Новейшие разработки в области сельскохозяйственной биотехнологии позволяют создавать биопрепараты с высокой эффективностью и низкой себестоимостью.

В Орловский государственным аграрном университете имени Н.В. Парахина на кафедре биотехнологии был получен патент №2636174 «Средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта» [1]. Средство создано на основе веществ и компонентов клеток, обладающих защитно-стимулирующим действием, повышающими иммунитет, способствующими увеличению ростовой активности растений, защите их от болезней и вредителей и в конечном итоге повышению урожайности овощных культур закрытого грунта [1].

В 2017 г. были проведены испытания запатентованного биологического пестицида в лабораториях ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» и ЦКП «Биотехнология микроклонального размножения картофеля и в закрытом грунте.

Биологический пестицид был исследован на томате закрытого грунта «Санька» и «Сердцеед», огурце закрытого грунта «Герман» и «Дружная семейка» и картофеле «Крепыш» и «Голубизна». Показано, увеличение всхожести томатов на 8%, огурца на 20 %, картофеля на 11,5% под влиянием исследуемого биологического пестицида, по сравнению с контролем. Исследуемое средство эффективно снизило развитие таких заболеваний как бурую гниль томата закрытого грунта, аскохитоз огурца, фитофтороз и обыкновенную паршу картофеля. Биологический пестицид показал свою биологическую эффективность, тем самым позволил сохранить урожай, за счет снижения потерь от болезней. Фунгистатическое действие препарата обусловлено компонентным составом биологического пестицида.

Биологический пестицид позволяет снизить пестицидную и нитратную нагрузку и тем самым способен удешевить овощеводческую продукцию и повысить урожайность культур в условиях защищенного грунта, что особенно актуально в условиях создания продовольственной безопасности [1]. Испытанное биологическое средство позволило добиться повышение урожайности томата «Санька» на 17,3%, «Сердцеед» на 11,1%, огурца «Герман F1» на 3,9%, «Дружная семейка» на 6,4%, картофеля «Крепыш» на 6,8%, «Голубизна» на 15,7%. Получен значительный экономический эффект при использовании биологического пестицида, он показал себя, как препарат широкого спектра действия. На овощных культурах удалось добиться повышения урожайности и товарности продукции. Это еще раз доказывает, что использование биологических пестицидов в овощеводстве закрытого грунта выгодно и эффективно [2].

Работа поддержана грантом Министерством сельского хозяйства РФ. Протокол заседания Научно-технического совета (НТС) университета от 27.12.2016 г. № 1

### Литература:

1. Павловская, Н.Е. Средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта/ Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Бородин Д.Б., Солохина И.Ю., Гнеушева И.А., Костромичева Е.В., Лушников А.В., Рожкова Т.С./патент на изобретение RUS 2626174 09.02.2016
2. Павловская, Н.Е. Биотехнология создания экологически безопасных средств защиты растений от болезней и вредителей. Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Бородин Д.Б., Горькова И.В., Борзенкова Г.А. В сборнике: Труды Международного форума по проблемам науки, техники и образования 2010. С. 151-153.

UDC 635.012

## THE USE OF BIOLOGICAL PESTICIDES IN VEGETABLE-GROWING GREENHOUSE

**Pavlovskaya N. E. Borodin D. B., Gagarina I. A. Yakovlev I. V.**

*FSBEI "Orenburg state agrarian University"*  
Orel, Russia  
302019, Orel, Generala Rodina, d. 62, kv. 29  
e-mail [ninel.pavlovsckaya@yandex.ru](mailto:ninel.pavlovsckaya@yandex.ru)

Developed, obtained and patented a biological pesticide for vegetable crops in greenhouses. This drug increases the energy of germination, germination rate, height and productivity of tomato, cucumber and potato. The studied biological pesticide reduces the spread of diseases and increases the yield of vegetable crops.

**Key words:** biological pesticides, biological products, indoor soil

Successful development of vegetable production in greenhouses in conditions of food sanctions and the need for organic vegetable production depends on the creation and introduction in manufacture of biological pesticides and growth stimulants that reduce chemical loads and high yields [2]. The latest developments in the field of agricultural biotechnology allow you to create biologics with high efficiency and low cost.

In Orel state agrarian University named after N. In. Parakhina at the Department of biotechnology has received a patent No. 2636174 "Means for presowing treatment of seeds of vegetable cultures in the protected ground" [1]. The tool is based on the substances and components of cells, having a protective and stimulating effect, boosting immunity, promoting an increase in growth activity of the plants, protecting them from diseases and pests and ultimately to increase the yield of vegetable crops in greenhouses [1].

In 2017 were tested patented biological pesticide in the laboratories of the NBI "Orel regional centre of agricultural biotechnology" and CCU "Biotechnology of micropropagation of potato and in greenhouses.

Biological pesticide were investigated on tomato in greenhouses of "Sanka" and "Heartbreaker", the cucumber greenhouse "German" and "hazel" and potatoes "Burly" and "Blue". Shown to increase germination of tomatoes by 8% cucumber 20 %, potatoes by 11.5% under the influence of the studied biological pesticide in comparison with control. The study effectively reduced the development of such diseases as brown rot of tomato in greenhouses, Anthracnose of cucumber, late blight and common scab of potatoes. Biological pesticide has shown its biological efficiency, thus helped to save the crop by reducing losses from disease. Fungistatic effects of the drug are due to the component composition of biological pesticide.

Biological pesticide allows to reduce pesticide and nitrate load and thus is able to reduce the cost of vegetable production and increase the yield of crops in the protected ground, which is especially important in terms of creating food security [1]. Tested biological means possible to achieve higher yields of tomato "Sanka" is 17.3%, "Heartbreaker" by 11.1%, cucumber "German F1" by 3.9%, "Friendly family" of 6.4 per cent, potatoes "Fortress" 6.8%, "Blue" by 15.7%. Obtained a significant economic benefit to the use of biological pesticide, he showed himself as a broad-spectrum drug. Vegetable crops failed to improve the yield and marketability of products. It proves once again that the use of biological pesticides in vegetable growing of the closed soil in an efficient and profitable [2].

The work was supported by a grant from the Ministry of agriculture of the Russian Federation. The minutes of the meeting of the Scientific and technical Council (STC) of the University from 27.12.2016, No. 1

### References:

1. Pavlovskaya, N. E. Means for presowing treatment of seeds of vegetable cultures in the protected ground conditions/Pavlovskaya N. E. Gagarina I. N., Borodin D. B., Solokhina I. Yu., Gneushev I. A., Kostromicheva E. V., Lushnikov, A. V., Rozhkova T. S.//the patent for invention RUS 2626174 09.02.2016
2. Pavlovskaya, N. E. Biotechnology is the creation of ecologically safe means of plant protection from diseases and pests. Pavlovskaya N. E. Gagarina I. N., Borodin D. B., Gor'kova I. V., Borzenkova G. A. In the book: proceedings of the International forum on problems of science, technology and education in 2010. P. 151-153.

УДК: 637.055, ББК: 36.95

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОЛИЗАТОВ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ КОРОВЬЕГО МОЛОКА ПРИ РАЗРАБОТКЕ ТВОРОЖНОГО МУССА ОБОГАЩЕННОГО АПФ-ИНГИБИРУЮЩИМИ ПЕПТИДАМИ

А.Г. Кручинин

Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН / ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности", Российская Федерация, 109383, Москва, Шоссейная, 47, jhon-87@mail.ru, +79197749764

Разработана композиция нового функционального аэрированного творожного мусса, обогащенного АПФ-ингибирующими пептидами сывороточных белков коровьего молока, с нежной кремообразной консистенцией и высокой стабильностью структуры продукта. Биофункциональные, хорошие органолептические и структурно-механические свойства продукта обусловлены внесением гидролизатов молочных белков подсырной сыворотки и бинарной композиции полисахаридов – гуаровой камеди и тыквенного пектина.

**Ключевые слова:** Белковый гидролизат, подсырная сыворотка, АПФ-ингибирующие пептиды, пектин тыквенный, мусс творожный, функциональный продукт

В современном обществе проблема питания остается одной из наиболее важных, как в социально-экономическом, так и в медицинском аспектах. Возросший интерес потребителей к продуктам, которые способствуют снижению риска развития хронических дегенеративных заболеваний (в т.ч. диабета второго типа и гипертонии), стимулирует разработку рецептур молочных десертов, содержащих функциональные ингредиенты, таких как пребиотические волокна и биологически активные пептиды сывороточных белков коровьего молока [1]. Среди различных видов молочных десертов муссы являются перспективными пищевыми матрицами для изучения эффектов включения функциональных ингредиентов [2].

Для разработки функционального аэрированного молочного продукта, обогащенного АПФ-ингибирующими пептидами, было использовано два типа гидролизата сывороточных белков коровьего молока: гидролизат,  $\beta$ -,  $\kappa$ -,  $\alpha$ s1 -,  $\alpha$ s2 – фракций казеина (Гидролизат-I) и гидролизат сывороточных белков  $\alpha$ -лактальбумина и  $\beta$ -лактоглобулина (Гидролизат-II), полученных ферментативным гидролизом концентратов подсырных сывороток [3]. Нами показано, что данные белковые гидролизаты обладали АПФ-ингибирующей активностью в системе *invitro* [3] и выраженными гипотензивными свойствами *in vivo* модели с использованием крыс линии SHRc устойчиво высоким уровнем артериального давления (снижение артериального давления на 27 и 20 мм рт. ст. при внутрижелудочном введении гидролизатов I и II соответственно).

При разработке функционального творожного мусса замена в базовой рецептуре цельного молока на гидролизаты I и II повышала АПФ-ингибирующую активность получаемых продуктов в 5 и 9 раз соответственно ( $IC_{50}$  5,13 и 2,69 по сравнению с 24 мг белка/мл в контрольном образце). Однако при этом реологические показатели опытных образцов муссов ухудшались, по сравнению с контролем (вариантом без добавления гидролизатов). Известен синергетический эффект бинарных систем полисахаридов в стабилизации структуры молочных продуктов, в том числе при использовании пектина с высокой степенью этерификации и растительных камедей [4]. Для стабилизации структуры муссов, обогащенных гидролизатами I и II, в рецептуру с гуаровой камедью нами был дополнительно включен тыквенный пектин. Использование пектина с гуаровой камедью в соотношении 1:1 (в/в) приводило к образованию стойкой мелкодисперсной пены, при этом консистенция муссов была однородной и воздушной. Увеличение дозы пектина приводило к излишне плотной консистенции продукта.

Результаты проведенных нами исследований показывают перспективность использования в качестве функциональных пищевых ингредиентов – гидролизатов молочных белков и тыквенного пектина при разработке аэрированных продуктов с биофункциональными свойствами.

Литература:

1. Nongonierma A.B., FitzGerald R.J. Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides // Trends in Food Science & Technology. 2016. Vol. 50. P. 26-43. 2. Cardarelli H.R., Aragon-Alegro



L.C., Alegro J.H.A., et al. *Effect of inulin and Lactobacillus paracasei on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse* // *J. Sci. Food. Agric.* 2008. Vol. 88. P. 1318–1324. 3. Торкова А.А., Рязанцева К.А., Агаркова Е.Ю. и др. *Рациональный дизайн ферментных композиций для получения функциональных гидролизатов сывороточных белков коровьего молока* // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017. Том 53. № 6. С. 1–12. 4. Kiani H., Mousavi M.E., Razavi H., et al. *Effect of gellan, alone and in combination with high-methoxy pectin, on the structure and stability of doogh, a yogurt-based Iranian drink* // *Food Hydrocolloids.* 2010. Vol. 24. P. 744-754.

**Финансирование:** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00094).

UDC: 637.055, ББК: 36.95

## USAGE OF COW'S MILK WHEY PROTEIN HYDROLYSATES FOR DEVELOPMENT OF QUARK MOUSSE ENRICHED BY ACE - INHIBITING PEPTIDES

**A.Kruchinin**

*The Institute of Biochemistry after A.N. Bakh of the Federal Investigation Center "Fundamental basis of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia /The Federal State Budget Institution "All-Russian Dairy Research Institute", Moscow, Russia, Russian Federation, 109383, Moscow, Shosseynaya, 47*

The composition of the new functional aerated quark mousse enriched by ACE-inhibiting peptides of cow's milk whey proteins with tender creamy consistency and high stability of the product structure has been developed. Biofunctional, good sensory and structural-mechanical properties of the product are stipulated by application of milk whey proteins hydrolysates and polysaccharides binary composition – guar gum and pumpkin pectin.

**Key words:** Protein hydrolysate, whey, ACE -inhibiting peptides, pumpkin pectin, quark mousse, functional product

In the modern society the nutrition problem is one of the most important in the socio-economic as well as in the medical aspects. The growing interest of consumers to the products which promote to reduce the risk of chronic degenerate diseases development (incl. diabetes and hypertension), stimulates the development of milk desserts receipts composing functional ingredients such as prebiotic fibers and biologically active peptides of cow's milk whey proteins [1]. Mousses among different milk desserts are the perspective food matrix for investigation of the effects of functional ingredients application [2].

In the process of the functional aerated milk product development enriched with ACE-inhibiting peptides two types of cow's milk whey protein hydrolysate were used: hydrolysate,  $\beta$ - ,  $\kappa$ ,  $\alpha$ s1 - ,  $\alpha$ s2 – casein fractions (Hydrolysate-1) and whey proteins hydrolysate  $\alpha$  - lactalbumine and  $\beta$  - lactoglobuline (Hydrolysate –II) obtained by fermentative hydrolysis of whey concentrates [3]. We showed that the said protein hydrolysates possessed ACE-inhibiting activity in vitro system [3] and the expressed hypotensive properties in vivo in the model using rats of SHR line with persistently high level of arterial pressure (reduction of arterial pressure by 27 and 20 mm of mercury column at intragastric application of Hydrolysates I and II, respectively).

During the development of the functional quark mousse the replacement in the basic receipt of whole milk by hydrolysates I and II increases ACE-inhibiting activity of the obtained products by 5 and 9 times respectively (IC 50 5,13 and 2,69 comparing to 24 mg of protein/ml in the control sample). But in this case the rheological index of mousses control samples deteriorated comparing to the controls (variants without hydrolysates addition). The synergistic effect of polysaccharide binary systems in stabilization of milk products structure is known including the usage of pectin with high degree of etherification and vegetable gums [4]. For stabilization of mousses structure enriched with Hydrolysates I and II we additionally included pumpkin pectin in the receipt with guar gum. Usage of pectin with guar gum in the ratio of 1:1 (w/w) resulted in formation of stable fine-dispersed foam and simultaneously mousses consistence was homogeneous and aerial. Increase of pectin dose resulted in over firm consistency of the product.

The results of the mentioned investigations show the perspectivity of usage - as the functional food ingredients - milk proteins hydrolysates and pumpkin pectin in development of aerated products with biofunctional properties.

*References:*

1. Nongonierma A.B., FitzGerald R.J. *Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides* // *Trends in Food Science & Technology.* 2016. Vol. 50. P. 26-43. 2. Cardarelli H.R., Aragon-Alegro

L.C., Alegro J.H.A., et al. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse // *J.Sci.Food. Agric.* 2008. Vol. 88. P. 1318-1324 3. Torkova A.A., Ryazanseva K.A., Agarkova E.Yu., et al. The rational design of ferment compositions for production of functional hydrolysates of cow's milk whey proteins. 4. Kiani H., Mousavi M.E., Rasavi H., et al. Effect of gellan, alone and in combination with high-methoxy pectin, on the structure and stability of doogh, a yogurt-based Iranian drink// *Food Hydrocolloids*. 2010. Vol.24. P. 744-754

**Grant:** The investigations have been realized under the financial support of the Russian scientific fund (project No. 16-16-000094).

УДК 57.083.331

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДОВИЗУАЛЬНОЙ ЗАРАЖЕННОСТИ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕЛКОВЫХ КОМПОНЕНТОВ РАСТЕНИЙ

Гагарина И.Н., Павловская Н.Е., Гаврилова А.Ю., Солохина И.Ю.

Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина, Орёл, Россия  
302019, Орел, ул. Генерала Родина, д.69  
e-mail: i-gagarina@list.ru

Разработаны методы довизуального тестирования зараженности болезнями овощных культур по реакции агглютинации с белковыми растительными компонентами – лектинами с последующим параллельным подтверждением результатов методом ПЦР-анализа с электрофоретической детекцией в агарозном геле.

**Ключевые слова:** довизуальная диагностика, овощные культуры, лектины, агглютинация, ПЦР-анализ.

В условиях импортозамещения получение качественной отечественной овощной продукции является первоочередной для сельхозпроизводителей. Распространение заболеваний бактериальных, вирусных и грибковых значительно снижает урожайность и рентабельность овощеводства. Для проведения своевременных защитных мероприятий необходима довизуальная диагностика, начиная с первых этапов развития растений. Необходимы доступные, недорогостоящие способы тестирования при сохранении точности диагностирования.

Известно, что для распознавания патогенов при помощи белковых компонентов, растения используют специальные механизмы, т.е. защитные белки, которые реагируют на углеводы, широко распространенные среди потенциальных патогенов, например, на хитин, входящий в состав клеточной стенки большинства грибов. Известны случаи избирательного взаимодействия, когда одни штаммы какого-нибудь вида бактерии эффективно обезвреживаются растительными лектинами, а другие – нет, так как, большинство бактерий выделяют в больших количествах во внешнюю среду специальные полисахариды, которые связываются с защитными растительными лектинами и не дают им добраться до самой бактерии. Именно поэтому представляется возможным применение растительных белковых компонентов для раннего, довизуального обнаружения зараженности овощных культур, таких как томаты, огурцы и картофель.

Разработаны методы довизуального тестирования томатов, огурцов и картофеля по реакции агглютинации в случае специфичности растительных белковых компонентов по отношению к вирусам, бактериям и грибам, по которой можно судить о развитии зараженности. В качестве контроля, подтверждающего полученные результаты, использовали параллельную постановку ПЦР-анализа с электрофоретической детекцией в агарозном геле.

Работа выполнена в ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина» по заказу Минсельхоза по теме: «Разработка методик тестирования посадочного материала, выращенного методом *in vitro* на безвирусной основе» в 2017 г.

Литература:

1. Бабоша А.В. Лектины и проблема распознавания фитопатогенов растением-хозяином//Молекулярная биология. - Ботаника. – 2008.<http://elementy.ru/genbio/molecularT>. 69, № 5. – С. 379-396.

UDC 57.083.331

## INVESTIGATION OF THE DIVISUAL INFLUENCE OF VEGETABLE CROPS WITH THE USE OF PROTEIN COMPOUNDS OF PLANTS

Gagarina I.N., Pavlovskaya N.E., Gavrilova A.Yu., Solokhina I.Yu.

Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhina, Oryol, Russia  
302019, Oryol, st. Generala Rodina, 69.

Methods for pre-visual testing of contamination by vegetable diseases by the agglutination reaction with protein plant components - lectins, followed by parallel confirmation of the results by PCR-analysis with electrophoretic detection in an agarose gel were developed.

**Key words:** pre-visa diagnostics, vegetable cultures, lectins, agglutination, PCR analysis.

In terms of import substitution, obtaining high-quality domestic vegetable products is a priority for agricultural producers. The spread of bacterial, viral and fungal diseases significantly reduces the yield and profitability of vegetable growing. To conduct timely protective measures, there is a need for pre-diagnostic diagnostics, beginning with the first stages of plant development. Needed affordable, low-cost testing methods while maintaining the accuracy of diagnosis.

It is known that for the recognition of pathogens with protein components, plants use special mechanisms, i.e. protective proteins that react to carbohydrates, widely distributed among potential pathogens, for example, on chitin, which is part of the cell wall of most fungi. There are cases of selective interaction, when some strains of a certain type of bacteria are effectively neutralized with plant lectins, while others are not, since most bacteria release large amounts of special polysaccharides into the external environment that bind to protective plant lectins and prevent them from reaching the bacteria itself.

That is why it is possible to use vegetable protein components for early, pre-visual detection of contamination of vegetable crops, such as tomatoes, cucumbers and potatoes.

Methods of pre-visual testing of tomatoes, cucumbers and potatoes on the agglutination reaction were developed in the case of specificity of plant protein components in relation to viruses, bacteria and fungi, which can be used to judge the development of infection. As a control confirming the results obtained, a parallel setting of PCR analysis with electrophoretic detection in an agarose gel was used.

The work was carried out at the Orel Regional Center for Agricultural Biotechnology, FGBOU VO "Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin "Commissioned by the Ministry of Agriculture on the theme: "Development of methods for testing planting material grown in vitro on a virus-free basis "in 2017.

### References:

Babosh A.V. *Lectins and the problem of recognition of phytopathogens by the host plant// Molecular biology. - Botany. - 2008. T. 69, No. 5. - P. 379-396.*

УДК 637.1

## ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА НА ТЕСТ-ШТАММЫ S.AUREUS

Ильина А.М.

Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности  
г.Москва, Россия  
115093, г.Москва, ул. Люсиновская,35, корп.7  
e-mail: vnimi5@rambler.ru

Биологически активные сывороточные белки молока существуют в виде защитного комплекса, потенциал которого далеко не исчерпан и представляет собой широкое поле для проведения работ по созданию и изучению новых биологически активных препаратов полифункционального действия, а также, обогащения ими продуктов питания.

**Ключевые слова:** комплекс белков, молока

Разработана технология получения комплекса биологически активных белков молока «лактопероксидаза-лактоферин-иммуноглобулин» (Л-ПФИ) для использования его в качестве основы БАД и продуктов лечебно-профилактической направленности.

Цель настоящей работы - исследовать ингибирующее воздействие комплекса биологически активных белков молока «лактопероксидаза-лактоферин-иммуноглобулин» из молочного сырья на *Staphylococcus aureus*.

Антибактериальную активность исследуемых образцов проверяли в отношении условно – патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, которые являются наиболее распространенными и часто встречающимися в молоке бактериями и являются значимыми возбудителями пищевых токсикозов. Была изучена антимикробная активность монокомпонентов и комплекса. Результаты изучения действия лактопероксидазы и лактоферрина на *S.aureus* не выявили фактора, приводящего к гибели клеток. Однако, отмечено наличие факторов, сдерживающих размножение грамположительных бактерий. Лактопероксидаза обеспечивала сохранение первоначального уровня клеток тест-культуры *S.aureus* в течение 3 часов культивирования. В присутствии лактоферрина, также, не отмечалось заметного увеличения количества клеток золотистого стафилококка в течение равного периода времени культивирования. Наибольшую бактериостатическую активность в отношении *S. aureus* проявлял иммуноглобулин. В течении 24 часов культивирования количество клеток увеличилось лишь на 0,8 lg КОЕ/см<sup>3</sup>. Таким образом, при культивировании тест – штамма *St.aureus* в присутствии белковых монокомпонентов отмечено проявление их бактериостатических свойств. Однако, при этом бактерицидный эффект установлен не был.

При культивировании тест-штамма *S.aureus* в присутствии разработанного комплекса белков «лактопероксидаза-лактоферин-иммуноглобулин» было зафиксировано максимальное в проведенных исследованиях ингибирование клеток по сравнению с контролем: в процессе культивирования в течении 24 часов количество клеток сокращалось на 3,0 lg КОЕ/см<sup>3</sup> по сравнению первоначальной концентрацией тест-культуры

Показано, что комплекс белков вызывает гибель и замедляет рост грамположительных (*S.aureus*) бактерий, в то время как монокомпоненты комплекса обладают только бактериостатическими свойствами. Полученные данные свидетельствуют о наличии синергитического эффекта изученных сывороточных белков.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют рассматривать разработанный комплекс сывороточных белков молока в качестве биологически активного компонента для создания новых продуктов функционального назначения

UDK 637.1

## INVESTIGATION OF INHIBITORY EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE MILK PROTEINS ON S-AUREUS TEST –STRAINS

Ilyina A.M.

*The Federal State Budget Scientific Institution All-Russian Dairy Research Institute  
Moscow, Russian  
115093, Moscow, Lusinovskaya str., 35, Bld. 7  
e-mail: vnimi5@rambler.ru*

Biologically active milk whey proteins exist in the form of protective complex which potentially has not been exhausted so far and represent broad field for development and investigation of new biologically active preparations of semi-functional action as well as enrichment of food products by them.

**Keywords:** active proteins, milk

The technology of biologically active milk proteins complex “lactoperoxidase-lactoferrin-immunoglobulin” (L-PFI) production for its usage as BAS basis and medioprophyllactic products has been developed.

The aim of the study is to investigate the inhibitory effect of biologically active milk proteins complex “lactoperoxidase-lactoferrin-immunoglobulin ” from milk raw materials on *Staphylococcus aureus*.

Antibacterial activity of the tested samples was tested in relation to opportunistic microorganisms – *Streptococcus aureus* which are the most wide-spread and abundant bacteria in milk being the important agent of alimentary toxicosis. The antibacterial activity of monocomponents and the complex has been

studied.

The investigation results of lactoperoxidase and lactoferrin effect on *S.aureus* didn't reduce the factors resulting in cells death. However the existence of the factors restraining the generation of gram-positive bacteria have been recorded. Lactoperoxidase provided the preservation of the initial cells level of test-culture *S.aureus* within 3 hours of cultivation. Moreover in the presence of lactoferrin the marked increase of the number of *S.aureus* was not registered within the equal cultivation time period. The highest bacteriostatic activity relating to *S.aureus* was shown by immunoglobulin. Within 24 hours of cultivation the number of cells was increased only by 0.8 lg CFU/cm<sup>3</sup>. Thus during cultivation of *St. aureus* test-strains in the presence of protein monocomponents their bacteriostatic properties were revived. But the bactericidal effect was not registered.

During cultivation of *S.aureus* test strains in the presence of the developed protein complex "lactoperoxidase-lactoferrin-immunoglobulin" the maximum inhibition of cells was registered comparing to the control: during cultivation within 24 hours the number of cells was decreased by 3,0 lg CFU/cm<sup>3</sup> comparing to the initial concentration of the test-culture.

It was shown that the protein complex causes the death and delays growth of gram-positive *S.aureus* while the complex monocomponents possess only bacteriostatic properties. The obtained data evidence the presence of synthetic effect of the studied whey proteins.

Thus the results of the carried out investigations make it possible to consider the developed complex of milk whey proteins as the biologically active component for creation of new functional products.

УДК 641:613.2

## КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РОСТА СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ И БАЦИЛЛ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРЕБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.

**Евдокимова С.А., Мищенко А.С., Грошева В.Д., Кареткин Б.А., Гусева Е.В., Панфилов В.И.**

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия, 125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20.  
e-mail: s.a.evdokimova@gmail.com*

Определены кинетические закономерности роста пробиотического (*Bifidobacterium adolescentis*) и непобиотического (*Bacillus cereus*) микроорганизмов в среде с олигофруктозой. Разработана модель ингибирования роста бацилл органическими кислотами, продуцируемыми бифидобактериями, описывающая их селективное стимулирование пребиотиками *in vitro*.

**Ключевые слова:** пребиотики, пробиотики, ингибирование, модель, пребиотическая активность.

Микробиоценоз кишечника человека представлен огромным числом разнообразных групп микроорганизмов, которые находятся в сложных межвидовых взаимоотношениях друг с другом. Возможность стимулирования пребиотиками роста полезной микрофлоры в этом сообществе показана во многих исследованиях, как с чистыми, так и со смешанными культурами [1-3]. Определяющая роль в стимулировании бифидобактерий в данной работе отводится кинетическим параметрам модели роста культур на среде с пребиотиком, основанной на снижении удельной скорости роста неспецифических бактерий вследствие образования пребиотиками ингибиторов, в частности, молочной, уксусной и пропионовой кислот. Применение математического моделирования для описания закономерностей развития данной смешанной культуры позволит разработать способ определения пребиотической активности, учитывающий недостатки существующих методов.

Для построения модели была выбрана простейшая бинарная система, состоящая из пробиотика - *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 и непобиотика - *Bacillus cereus* ATCC 11778. В качестве тестового пребиотика использовали олигофруктозу (Orafti P95).

Взаимодействие в такой смешанной культуре может быть описано посредством системы уравнений экспоненциального роста и образования продуктов:

$$\begin{cases} x^{Bb} = x_0^{Bb} \cdot e^{\mu_{max}^{Bb} t} \\ I \equiv P = Y_{P/X} \cdot (x^{Bb} - x_0^{Bb}) = Y_{P/X} \cdot x_0^{Bb} \cdot (e^{\mu_{max}^{Bb} t} - 1) \\ \frac{dx^{Bc}}{dt} = \mu \cdot x^{Bc} \end{cases} \quad (1)$$

где  $x^{Bb}$  и  $x^{Bc}$  – содержание *Bif. adolescentis* и *Bac. cereus* в текущий момент ферментации  $t$ ,  $x_0^{Bb}$  и  $x_0^{Bc}$  – их содержание в момент инокуляции,  $\mu_{max}^{Bb}$  и  $\mu_{max}^{Bc}$  – максимальные удельные скорости роста,  $I (P)$  – концентрация ингибитора,  $Y_{P/X}$  – экономический коэффициент образования метаболита по биомассе. С другой стороны, для математического описания снижения удельной скорости роста (ингибирования) бацилл применима модель Иерусалимского или следующее уравнение:

$$\mu^{Bc} = \mu_{max}^{Bc} \cdot \left[1 - \left(\frac{[L]}{MIC_L}\right)^\alpha\right] \left[1 - \left(\frac{[A]}{MIC_A}\right)^\beta\right] \left[1 - \left(\frac{[P]}{MIC_P}\right)^\gamma\right] \quad (2)$$

где  $[L]$ ,  $[A]$ ,  $[P]$  – концентрации непродиссоциировавших молочной, уксусной и пропионовой кислот, соответственно;  $MIC$  – минимальная концентрация ингибитора;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – константы. Для сравнительной оценки роста чистой культуры бацилл применяли модель Ферхюльста.

Таким образом, была разработана математическая модель и определены кинетические параметры роста микроорганизмов *Bif. adolescentis* и *Bac. cereus*. В дальнейшем целесообразно оценить достоверность данной модели с использованием других представителей непровиотических микроорганизмов кишечника, например, рода *Clostridium*.

Настоящее исследование спонсируется Российским Научным Фондом (Грант № 17-79-20365).

#### Литература:

- [1] Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J.A.E., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics// *Nutr. Res. Rev.* 2004. Vol. 17. P. 257–259.  
 [2] Huebner J., Wehling R.L., Hutkins R.W. Functional activity of commercial prebiotics// *Int Dairy J.* 2007. Vol. 17. P. 770–775,  
 [3] Бучахчан Ж. В., Алиева Л. Р., Куликова И. К., Евдокимов И. А., Каледина М. В., Жигулина О. В. Сравнение пребиотической активности производных хитозана и лактозы// *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета.* - 2011 - №73. – С. 1-12.

UDC 641:613.2.

## KINETIC MODEL OF MIXED CULTURE GROWTH OF BIFIDOBACTERIA AND BACILLI FOR ASSESSMENT PREBIOTIC ACTIVITY.

Evdokimova S. A., Mishchenko A. S., Grosheva V.D., Karetkin B.A., Guseva E. V., Panfilov V.I.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow,  
 125480, Geroev Panfilovtsev st., 20, Moscow, Russia  
 e-mail: s.a.evdokimova@gmail.com

The kinetic regularities of the growth of probiotic (*Bifidobacterium adolescentis*) and non-probiotic (*Bacillus cereus*) microorganisms in a medium with oligofructose are determined. The model for growth inhibition of bacilli by organic acids produced by bifidobacteria, which describes their selective stimulation with prebiotics in vitro was developed.

**Key words:** prebiotics, probiotics, inhibition, model, prebiotic activity.

Microbiocenosis of the human intestine is represented by a huge number of diverse groups of microorganisms that are in complex interspecific relationships with each other. The possibility of stimulating prebiotic growth in beneficial members of this community is shown in many studies with both pure and mixed cultures [1-3]. The determining role in the stimulation of bifidobacteria in this work is given to the kinetic parameters of the cultures growth model on a medium with a prebiotic, based on the decrease in the specific growth rate of nonspecific bacteria due to the formation of probiotics inhibitors, in particular, lactic, acetic and propionic acids. Application of a mathematical model to describe the patterns of this mixed culture germination will allow developing a technique for determination of prebiotic activity that takes into account the shortcomings of existing methods.

To construct the model, the simple binary system consisting of a probiotic (*Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703) and non-probiotic (*Bacillus cereus* ATCC 11778). Oligofructose (Orafti P95) was used as the test prebiotic.

The interaction in such mixed culture can be described by means of the system of equations including exponential growth and products formation:

$$\begin{cases} x^{Bb} = x_0^{Bb} \cdot e^{\mu_{max}^{Bb} t} \\ I \equiv P = Y_{P/X} \cdot (x^{Bb} - x_0^{Bb}) = Y_{P/X} \cdot x_0^{Bb} \cdot (e^{\mu_{max}^{Bb} t} - 1) \\ x^{Bc} = x_0^{Bc} \cdot e^{\mu^{Bc} t} \end{cases} \quad (1)$$

where  $x^{Bb}$  and  $x^{Bc}$  – concentration of *Bif. adolescentis* and *Bac. cereus* at the current moment of fermentation  $t$ ,  $x_0^{Bb}$  and  $x_0^{Bc}$  – their concentration at the time of inoculation,  $\mu_{max}^{Bb}$  and  $\mu_{max}^{Bc}$  – maximum specific growth rates,  $I (P)$  – concentration of inhibitor,  $Y_{P/X}$  – yield of biomass metabolite production. On the other hand, for the mathematical description of the decrease in the specific rate of growth (inhibition) of bacilli, the model of products inhibition or the following equation:

$$\mu^{Bc} = \mu_{max}^{Bc} \cdot \frac{pH - pH^{min}}{pH^{opt} - pH^{min}} \cdot \left[1 - \left(\frac{[L]}{MIC [L]}\right)^\alpha\right] \left[1 - \left(\frac{[A]}{MIC [A]}\right)^\beta\right] \left[1 - \left(\frac{[P]}{MIC [P]}\right)^\gamma\right] \quad (2)$$

where  $[L]$ ,  $[A]$ ,  $[P]$  – concentrations of non-dissociated lactic, acetic and propionic acids, respectively; MIC – minimum inhibitor concentration;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  – constants. The model of Verhulst was used for the comparative evaluation of the pure culture growth of bacilli.

Thus, the mathematical model was developed and the kinetic parameters of *Bif. adolescentis* and *Bac. cereus* growth were determined. In the future it is advisable to evaluate the reliability of this model using other representatives of non-probiotic microorganisms of the intestine, for example, Clostridium.

Present study was sponsored by Russian Science Foundation (Project № 17-79-20365).

References:

- [1] Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J.A.E., Roberfroid M.B., Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics, *Nutr. Res. Rev.*, vol. 17, pp 257–259, 2004.
- [2] Huebner J., Wehling R.L., Hutkins R.W., Functional activity of commercial prebiotics, *International Dairy Journal*, vol. 17, pp 770–775, 2007.
- [3] Buchakhchyan Z.R., Alieva L.R., Kulikova I. K., Evdokimov I. A., Kaledina M. V., Zhigulina O.V. Comparison of prebiotic activity of chitosan and lactose derivatives// *Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University*. 2011. №. 73. P. 1-12.

УДК 577.11

## К ВОПРОСУ РЕГУЛИРОВАНИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ЖИВОГО ОРГАНИЗМА С ПОМОЩЬЮ МИНОРНЫХ САХАРОВ

**Анохина Е. П., Иссува М. М., Корнеева О. С.**

*Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия  
394000, г. Воронеж, проспект Революции, 19  
e-mail: katya\_anoh@mail.ru*

Отмечена важная роль фукозилирования ооцитов в процессах оплодотворения у позвоночных: фукоза участвует в распознавании и адгезии сперматозоида к оболочке ооцита. Согласно собственным исследованиям введение фукозы в рацион опытных мышей способствовало увеличению степени фукозилирования ооцита и доли способных к оплодотворению яйцеклеток.

**Ключевые слова:** минорные сахара, фукоза, репродуктивная функция, фукозилирование, ооцит.

В настоящее время поиск веществ, способных регулировать репродуктивную функцию организма, является актуальной проблемой. Внимание отечественных и зарубежных ученых привлекают витамины, биологически активные вещества растительного происхождения [1, 2], а также минорные сахара, в частности фукоза [3]. Многие исследователи отмечают важную роль фукозилирования ооцитов в процессах оплодотворения у позвоночных. Установлено, что остатки фукозы сконцентрированы на поверхности яйцеклетки и непосредственно участвуют в распознавании и адгезии сперматозоида к оболочке ооцита за счет фукозидазы, локализованной на акросоме [4, 5, 6]. Собственные исследования на мышах показали, что введение фукозы в рацион опытных мышей способствовало увеличению степени фукозилирования ооцита и доли способных к оплодотворению яйцеклеток. Однако механизмы фукозилирования ооцитов и влияния фукозы на способность к оплодотворению, число и качество половых клеток разных организмов,

изучено недостаточно. Учитывая уникальную роль фукозы в репродуктивных процессах позвоночных, перспективным является исследование влияния фукозы на количество ооцитов, процент их созревания и оплодотворения, выход свободных эмбрионов объектов аквакультуры. Проводимые нами исследования по влиянию фукозы в рационе кормления рыб ценных пород на способность половых клеток к оплодотворению позволят разработать новые способы негормональной регуляции их репродуктивной функции.

Исследования проводятся при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №17-76-10059).

#### Литература:

1. Ghiasi S., Falahatkar B., Arslan M., Dabrowski K. *Physiological changes and reproductive performance of Sterlet sturgeon *Acipenser ruthenus* injected with thiamine* // *Anim Reprod Sci.* 2017. Vol. 178. P. 23-30.
2. Tizkar B., Kazemi R., Alipour A., Seidavi A., Naserlavi G., Ponce-Palafox JT. *Effects of dietary supplementation with astaxanthin and  $\beta$ -carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*)* // *Theriogenology.* 2015. Vol. 84 (7). P. 1111-1117.
3. Orczyk-Pawilowicz M. *The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease* // *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2007. Vol. 61. P. 240-52.
4. Intra J., Concetta V., Daniela de C., Perotti M. E., Pasini M. E. *Drosophila sperm surface alpha-L-fucosidase interacts with the egg coats through its core fucose residues* // *Insect Biochem Mol Biol.* 2015. Vol. 63. P. 133-43. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.06.011.
5. Romero-Aguirregomezcorta J., Matás C., Coy P.  *$\alpha$ -L-fucosidase enhances capacitation-associated events in porcine spermatozoa* // *Vet J.* 2015. Vol. 203 (1). P. 109-114. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.11.006.
6. Venditti J. J., Swann J. M., Bean B. S. *Hamster sperm-associated alpha-L-fucosidase functions during fertilization* // *Biol Reprod.* 2010. Vol. 82 (3). P. 572-579. doi: 10.1095/biolreprod.109.076695.

UDC 577.11

## TO THE PROBLEM OF REGULATION OF THE REPRODUCTIVE FUNCTION OF LIVING ORGANISM WITH THE HELP OF MINOR SUGAR

Anokhina E. P, Isuva M. M, Korneeva O. S.

Voronezh state university of engineering technologies, Voronezh, Russia  
 Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia  
 e-mail: katya\_anoh@mail.ru

An important role of fucosylation of oocytes in fertilization processes of vertebrates was noted: fucose are involved in the recognition and adhesion of the sperm cell to the oocyte membrane. According to our own research, the introduction of fucose into the diet of experimental mice has contributed to an increase to the degree of oocyte fucosylation and in the proportion of oocytes capable of fertilization.

**Key words:** minor sugars, fucose, reproductive function, fucosylation, oocyte.

At present, the search for substances that can regulate the reproductive function of the organism is an actual problem. Vitamins, biologically active substances of vegetable origin [1, 2], as well as minor sugars, in particular fucose [3] have attracted the attention of both Russian and foreign scientists. Many researchers note the important role of fucosylation of oocytes in fertilization processes of vertebrates. It is established that fucose residues are concentrated on the surface of the egg and are directly involved in the recognition and adhesion of the sperm cell to the oocyte membrane due to fucosidase localized on the acrosome [4, 5, 6]. Own research in mice have shown that the introduction of fucose into the diet of experimental mice has contributed to an increase to the degree of oocyte fucosylation and in the proportion of oocytes capable of fertilization. However, the mechanisms of oocyte fucosylation and the effect of fucose on ability to fertilize, the number and quality of reproductive cells of different organisms has not been studied enough. Given the unique role of fucose in the reproductive processes of vertebrates, promising is the study of the influence of fucose on the number of oocytes, the rate of their maturation and fertilization, the release of free embryos of aquaculture objects. The our research on the influence of fucose in the diet of feeding valuable fish on the reproductive cells ability to fertilize will lead to the development of new ways of non-hormonal regulation of their reproductive function.

The research is supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 17-76-10059).

#### References:

1. Ghiasi S., Falahatkar B., Arslan M., Dabrowski K. *Physiological changes and reproductive performance of Sterlet*



- sturgeon *Acipenser ruthenus* injected with thiamine // *Anim Reprod Sci.* 2017. Vol. 178. P. 23-30.
2. Tizkar B., Kazemi R., Alipour A., Seidavi A., Naseralavi G., Ponce-Palafox JT. Effects of dietary supplementation with astaxanthin and  $\beta$ -carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*) // *Theriogenology.* 2015. Vol. 84 (7). P. 1111-1117.
3. Orczyk-Pawilowicz M. The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease // *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2007. Vol. 61. P. 240-52.
4. Intra J., Concetta V., Daniela de C., Perotti M. E., Pasini M. E. *Drosophila* sperm surface alpha-L-fucosidase interacts with the egg coats through its core fucose residues // *Insect Biochem Mol Biol.* 2015. Vol. 63. P. 133-43. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.06.011.
5. Romero-Aguirregomez-corta J., Matás C., Coy P.  $\alpha$ -L-fucosidase enhances capacitation-associated events in porcine spermatozoa // *Vet J.* 2015. Vol. 203 (1). P. 109-114. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.11.006.
6. Venditti J. J., Swann J. M., Bean B. S. Hamster sperm-associated alpha-L-fucosidase functions during fertilization // *Biol Reprod.* 2010. Vol. 82 (3). P. 572-579. doi: 10.1095/biolreprod.109.076695.

УДК 637.4.04

## МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ИМУННО-ХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КОАГУЛИРОВАННОГО ЯИЧНОГО БЕЛКА

Стефанова И.Л. <sup>1</sup>, Мазо В.К. <sup>1</sup>, Зорин С.Н. <sup>2</sup>, Мокшанцева И.В. <sup>1</sup>, Клименкова А.Ю. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> «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

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», г. Москва, Россия  
109240, г. Москва, Устьинский проезд, дом 2/14

Целью работы явилось исследование биологической ценности коагулированного белка куриного яйца *in vivo* на растущих крысах-самцах линии Вистар и сравнительная иммунохимическая оценка его антигенности *in vitro*.

**Ключевые слова:** коагулированный белок куриного яйца, биологическая ценность, коэффициент эффективности белка, истинная усвояемость, антигенность.

Сравнительное исследование биологической ценности коагулированного белка куриного яйца (КБКЯ), нативного белка куриного яйца (БКЯ) и казеина коровьего молока (ККМ) *in vivo* на 50 растущих крысах-самцах линии Вистар свидетельствует о высокой биологической ценности КБКЯ полученного с использованием кислотно-солевого гидролиза и теплового нагрева. Полусинтетические рационы животных контрольной группы Г1 и опытных групп Г2 и Г3 содержали соответственно 20% ККМ, 20%БКМ и 20%КБКМ (по калорийности). Коэффициент эффективности белка для животных, получавших КБКЯ, был достоверно выше ( $1,96 \pm 0,04$ ) по сравнению со значениями КЭБ как для животных получавших ККМ ( $1,49 \pm 0,05$ ,  $p < 0,01$  соответственно), так и для животных получавших БКЯ ( $1,60 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ). Истинная усвояемость всех трех белков при этом практически не различалась

Не обнаружено статистических различий содержания холестерина, триглицеридов и ЛПНП для всех групп. Содержание ЛПВП в сыворотке крови крыс группы Г3 было достоверно выше ( $p < 0,01$ ) по сравнению с группой Г2, и при этом находилось в пределах нормы для данного вида животных.

Результаты иммуноферментного тестирования сохранности исходной антигенности овальбумина в коагулированном КБКЯ свидетельствуют, что тепловое воздействие в сочетании с подкислением раствора привело к снижению этого показателя в коагулированном белке по сравнению с нативным БКЯ более чем в 15 раз. Этот результат является важным дополнительным аргументом снижения потенциальной аллергенности КБКЯ и соответственно перспективности его использования в составе пищевых продуктов массового спроса и специализированных пищевых продуктах.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-16-04047).

UDC 637.4.04

## BIOMEDICAL AND IMMUNOCHEMICAL EVALUATION OF THE COAGULATED EGG ALBUMEN

Stefanova I.L. <sup>1</sup>, Mazo V.K. <sup>1</sup>, Zorin S.N. <sup>2</sup>, Mokshantseva I.V. <sup>1</sup>, Klimenkova A.Yu. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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 Province, Russia  
141552 Moscow Province, Solnechnogorsk district, township Rzhavki, Building 1  
e-mail: dp.vniipp@mail.ru

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Centre of Nutrition, Biotechnology and Food Safety", Moscow, Russia  
109240, Moscow, Ustinskiy proezd, house 2/14

The aim of the study was to investigate in vivo the biological value of the coagulated chicken egg white on growing Wistar male rats and a comparative immunochemical evaluation in vitro of its antigenic power.

**Key words:** coagulated chicken egg white, biological value, protein efficiency ratio, true digestibility, antigenic power.

The comparative evaluation of biological value of coagulated egg albumen (CEA), native egg albumen (NEA), and dairy casein (DC) was performed in vivo on 50 growing male Wistar rats. It was found that CEA obtained with the use of acid-salt hydrolysis and thermal treatment has high biological value. Semisynthetic diets for control group G1 and experimental groups G2 and G3 contained 20% of DC (calculated on the caloric basis), 20% of NEA, and 20% of CEA, respectively. Protein efficiency ratio (PER) from the diet with CEA ( $1.96 \pm 0.04$ ) was significantly higher in compare to both DC ( $1.49 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and NEA ( $1.60 \pm 0.02$ ,  $P < 0.05$ ) diets. True digestibility of all here protein sources was similar.

There were no significant differences between the groups in concentrations of total cholesterol, triglycerides, and low-density lipoproteins in the blood serum. Concentration of high-density lipoproteins in G3 group was significantly higher compared to G2 ( $P < 0.01$ ) and fell within the physiologically normal range.

The ELISA test for the preservation of initial antigenicity of ovalbumin in coagulated albumen products proved that thermal treatment in combination with acidification decreased this parameter more than 15-fold in compare to the native level. The coagulated products, therefore, are less allergenic in compare to the native egg albumen; this effect makes these products more prospective for the use in commercial food products including specialized foodstuffs.

The study was financed by Russian Science Foundation, grant 16-16-04047.

УДК: 637.1, ББК: 36.95

## МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РАЗРАБОТАННОГО КИСЛОМОЛОЧНОГО ПРОДУКТА С ПРОБИОТИЧЕСКИМ МИКРООРГАНИЗМОМ L. REUTERI LR1

Т.А.Раскошная, А.В.Бегунова

Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности", РФ, 115093, Москва, Люсиновская, 35, Raskatyana@yandex.ru, 89167879912

Разработаны технологии функциональных кисломолочных продуктов на основе L. reuteri LR1. Проведена медико-биологическая оценка разработанного кисломолочного продукта. Выявлено развитие реакции крыс на продукт – активацию иммунных процессов, входящими в состав продукта пробиотиками. Установлено усиление работы пищеварительного тракта при употреблении кисломолочного продукта.

**Ключевые слова:** пробиотический микроорганизм, кисломолочный продукт, биохимические показатели, лейкоциты, лимфоциты, гранулоциты, мочевины.

За последние годы были проведены многочисленные исследования по созданию кисломолочных продуктов, направленных на улучшение здоровья человека путем регулирования микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Кисломолочные продукты, содержащие пробиотические микроорганизмы, завоевывают все большую популярность у потребителей. В связи с этим поиск новых потенциальных пробиотических бак-

терий, так и углубленное изучение функциональных свойств уже зарекомендовавших себя пробиотических культур остается актуальным и постоянно востребованным в сфере пищевой биотехнологии и медицины.

В Центральной лаборатории микробиологии ФГБНУ ВНИМИ. был выделен и идентифицирован современными молекулярно-генетическими методами потенциальный пробиотический штамм *Lactobacillus reuteri* LR1, который показал выраженные антагонистические свойства к условно-патогенным и патогенным микроорганизмам. На основе этого штамма были разработаны биотехнологии производства новой линейки пробиотических кисломолочных продуктов с требуемыми показателями качества:

1. Культивирование чистой культуры *L. reuteri* LR1 на стерилизованном молоке с добавлением дрожжевого экстракта.
2. Совместное культивирование *L. reuteri* LR1 и ХТС (*Lactobacillus helveticus* NK1 и *Streptococcus thermophilus*).

С целью медико-биологической оценки разработанного кисломолочного продукта были проведены доклинические исследования в ФГБНУ «ФНЦ пищевые системы им. В.М. Горбатова» РАН. Результаты исследования показали (таблица 1), что в крови животных, потреблявших кисломолочный продукт с *Lactobacillus reuteri* LR1, отмечено увеличение мочевины, активности аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы, свидетельствующие об усилении работы пищеварительного тракта, в т.ч. усиленном синтезе мочевины.

Таблица 1.

Группа животных	Количество бифидобактерий, КОЕ/см <sup>3</sup>	Мочевина, ммоль/л	Щелочная фосфатаза, Е/л	Холестерин, ммоль/л	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Лимфоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Гранулоциты, 10 <sup>9</sup> /л
контроль	108	6,99	143,6	1,83	4,80	3,74	1,02
Кисломолочный продукт	108	7,12	116,9	1,83	4,50	3,88	0,59
Кисломолочный продукт с <i>L. reuteri</i> LR1	1010	9,01	163,1	2,37	2,99	2,58	0,39

Достоверное отличие  $P < 0.05$

Также отмечено увеличение концентрации общего холестерина до 30% относительно контрольной группы. У крыс, потреблявших разработанный кисломолочный продукт, выявлено снижение содержания лейкоцитов и лимфоцитов, а также общего и относительного содержания гранулоцитов, что может указывать на развитие реакции крыс на продукт с пробиотиками- активации иммунных процессов. У крыс, потреблявших разработанный продукт, отмечалось увеличение относительного содержания бифидобактерий в фекальных массах животных, что свидетельствует о способности стимулировать рост полезных симбиотических микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте *in vivo*.

1. Выделен и идентифицирован современными молекулярно-генетическими методами потенциальный пробиотический штамм *Lactobacillus reuteri* LR1
2. Разработана техническая документация на кисломолочный продукт ТУ 10.51.52-034-00419785-2017 «Продукт кисломолочный «Релакт» на основе штамма *Lactobacillus reuteri* LR1
3. Проведена медико-биологическая оценка разработанного кисломолочного продукта и установлены его функциональные свойства.

UDC 637.1, BBC 36.95

## THE MEDICAL-BIOLOGICAL EVALUATION OF THE DEVELOPED FERMENTED DAIRY PRODUCT WITH PROBIOTIC MICROORGANISM *L. REUTERI* LR1

**T.Raskoshnaya, A.Begunova**

*The Federal State Budget Scientific Institution "All-Russian Dairy Research Institution" "VNIIMI", Moscow, Russian, Russia, 115093, Moscow, Lusinovskaya, 35*

The technologies of the functional fermented dairy products based on *L.reuteri* LR1 have been developed. The medical-biological evaluation of the developed product was carried out. The development of rats' reaction for the product – activation of the immune response by probiotics composing the product composition - has been revealed. Enhancement of the intestinal tract function with the fermented dairy product usage has been stated.

**Key words:** probiotic microorganism, fermented dairy product, biochemical index, leucocytes, lymphocytes, granulocytes, urea

Within the recent years a lot of studies of the fermented dairy products aimed at the improving of humans' health by regulating the gastrointestinal tract microflora have been carried out. The popularity of the fermented dairy products composing probiotic microorganisms has been growing constantly. Due to this the search of new potential probiotic bacteria as well as the advanced study of the functional properties of the proved probiotic cultures is actual and constantly demanded in the field of food biotechnology and medicine.

The potential probiotic *Lactobacillus reuteri* LR1 strain showing the frank antagonistic properties against opportunistic and pathogenic microorganisms has been discovered and genetically identified in the FGBNU VNIMI Central Laboratory of Microbiology. The production technologies of the new line of probiotic fermented dairy products with the required quality properties based on this strain has been developed:

1. Cultivation of *L.reuteri* LR1 pure culture on sterilized milk with addition of yeast extract.
2. Combined cultivation of *L.reutri* LR1 and HTS (*Lactobacillus helveticus* NKI and *Streptococcus thermophilus*).

For the medical-biological evaluation of the developed fermented dairy product the pre-clinical studies in FGBNU " FNC food systems after V.M.Gorbatov of RAN " were carried out. The study's results revealed (Table 1) that the animals consuming the fermented dairy product with *Lactobacillus reuteri* LR1 showed the increased amount of urea in blood, activation of alanine aminotransferase and alkaline phosphatase the enhanced function of gastrointestinal tract including the enhancement of urea synthesis.

Table 1

Animals group	Bifidobacterium spp., CFU /cm <sup>3</sup>	Ureamml/l	Alkaliphosphatase, E/l	Cholesterol,mm/l	Leycocutes, 10 <sup>9</sup> /l	Lymphocetes, 10 <sup>9</sup> /l	Granulocetes, 10 <sup>9</sup> /l
Control	108	6,99	143,6	1,83	4,80	3,74	1,02
Fermented dairy product	108	7,12	116,9	1,83	4,50	3,88	0,59
Fermented dairy product with <i>L.reuteri</i> LR1	1010	9,01	163,1	2,37	2,99	2,58	0,39

Reliable difference  $P < 0.05$

Moreover the concentration of the total cholesterol up to 30% relative to the control group has been stated. The rats consumed the developed fermented dairy product showed the reduced amount of leucocytes and lymphocytes as well as total and relative granulocytes that show the development the rats reaction on the product – activation of immune processes by the probiotics composing the product composition. The feces of rats consuming the developed fermented dairy product showed the increased relative amount of bifidobacteria indicating about the ability to stimulate the growth of useful symbiotic microorganisms in the intestinal tract in vivo.

1. The new potential probiotic strain *Lacobacillus reuteri* LR1 has been isolated and genetically identified 2. The technical documentation for the fermented dairy product TD 10.51.52-034-00419785-2017 "The Fermented Dairy Product "Relakt" based on *Lacobacillus reuteri* LR1 has been developed 3. The medical-biological evaluation of the developed product was carried out. The functional properties of developed fermented products have been stated.

УДК 544.3.03:544.032: 544.77

## МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН КОМПОЗИЦИОННЫХ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ ПИЩЕВЫХ БИОПОЛИМЕРОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ: ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И ВОЗМОЖНОСТИ.

Зеликина Д. В., Антипова А.С., Семёнова М.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук. Москва, Россия.  
119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4. E-mail.: dusman.05@mail.ru

Рассмотрены современные подходы к созданию при помощи биополимеров инкапсулированных форм незаменимых биологически активных гидрофобных веществ и обогащению ими продуктов питания с низким содержанием жира.

**Ключевые слова:** пищевые ингредиенты, биологически активные липиды, пищевые биополимеры, инкапсулирование, молекулярный дизайн, функциональность.

Обогащение низкожирных продуктов питания биологически активными веществами (БАВ) гидрофобной природы, часто является сложной технологической задачей, поскольку требует соблюдения целого ряда условий, среди которых ключевыми являются: сохранение физиологической активности БАВ, обеспечение высокого уровня растворимости БАВ в пищевой матрице, а также эффективного высвобождения БАВ в условиях желудочно-кишечного тракта. Новым универсальным решением этой задачи может стать создание композиционных многофункциональных ингредиентов, которые, наряду с БАВ, содержат пищевые биополимеры, такие как белки и полисахариды. В данной работе рассмотрены современные принципы создания и регулирования функциональных свойств, а также перспективы использования таких ингредиентов для обогащения пищевых продуктов. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

UDK 544.3.03:544.032: 544.77

## MOLECULAR DESIGN OF THE COMPOSITE MULTIFUNCTIONAL INGREDIENTS BASED ON FOOD BIOPOLYMERS AND BIOACTIVE COMPOUNDS: THE GENERAL APPROACHES AND PERSPECTIVES

Zelikina D.V., Antipova A.S., Semenova M.G.

*N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences. Moscow, Russia. 119334, Moscow, Kosygin str, 4. E-mail.: dusman.05@mail.ru*

The current approaches of both the design of the encapsulated forms of essential bioactive hydrophobic compounds by food biopolymers and their use for the low-fat food fortification are considered in this work.

**Key words:** food ingredients, bioactive lipids, food biopolymers, encapsulation, molecular design, functionality.

The fortification of the low-fat foods by the bioactive compounds, in particular, of the hydrophobic nature, is a challenging task due to the additional technological demands such as maintaining of their physiological activity along with their both the high level of the solubility in a food matrix and the effective release in the gastro-intestinal tract. One of the new universal solutions of this challenge is a molecular design of the composite multifunctional ingredients that consist of the bioactive compounds together with the food biopolymers such as proteins and polysaccharides. This work presents the current approaches for both the formation and the regulation of the functional properties of such ingredients as well as the possibilities of their use for the food fortification.

This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 18-316-00111.

УДК 579.22

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ ДРОЖЖЕЙ РОДА RHODOTORULA

Червякова О.П., Симагина П.В., Макарова М.И., Суясов Н.А.

*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия 123480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20 e-mail: chervyakova85@mail.ru*

Показано, что внесение в глубинную культуру дрожжей рода *Rhodotorula* пероксида водорода, как агента окислительного стресса, приводит к повышению биосинтеза каротиноидных пигментов. При этом адаптированные культуры, полученные в результате многократных пересевов, сохраняют свою каротинсинтезирующую активность.

**Ключевые слова:** каротиноиды, *Rhodotorula*, окислительный стресс, пероксид водорода.

Дрожжи рода *Rhodotorula* представляют интересную группу микроорганизмов для использования в области биотехнологии, поскольку способны синтезировать различные каротиноидные пигменты, имеющие высокую

экономическую ценность, такие как  $\beta$ -каротин, торулин и торулародин. Промышленное применение этих микроорганизмов ограничено из-за низкой продуктивности пигмента.

Интенсифицировать процесс биосинтеза каротиноидов можно путем применения окислительного стресса. Данный подход позволяет мобилизовать адаптивные ресурсы микроорганизмов на уровне стимуляции их метаболизма. В результате стрессорного воздействия микроорганизмы приобретают более мощную окислительную систему, которая может проявляться в способности потреблять тяжело усваиваемый субстрат или сверх синтезе метаболитов. Так для интенсификации процесса биоконверсии отходов пищевой промышленности и повышения эффективности биодеструкции жиросодержащих отходов предлагают воздействовать на культуры дрожжей пероксидом водорода [1, 2]. Адаптация к окислительному стрессу позволяет усилить положительный эффект, полученный при разовом воздействии. Таким образом были получены бактериальные штаммы антагонистов автотрофных микроорганизмов, ухудшающих очистку сточных вод, с повышенной альгицидной активностью [3].

Нами было исследовано влияние пероксида водорода, как агента окислительного стресса, на каротиногенез четырех штаммов дрожжей рода *Rhodotorula*: *Rh. rubra* Y-1354, *Rh. rubra* Y-397, *Rh. glutinis* Y-608 (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов); *Rh. rubra* (РХТУ им. Д.И. Менделеева, кафедра биотехнологии). Установлено, что однократное воздействие пероксидом водорода, в количестве от 3,5 до 6,0 г/л (по 100%-ной  $H_2O_2$ ), путем введения его в глубинную культуру дрожжей, приводит к повышению биосинтеза каротиноидов в 1,5-2 раза [4]. При многократном воздействии стрессорным агентом путем многочисленных пересевов были получены адаптированные культуры дрожжей, у которых выход каротиноидных пигментов в 3-4 раза выше исходного. При этом адаптированные культуры сохраняли свою каротинсинтезирующую активность [5].

#### Литература.

1. Смирнова В.Д., Балакирев И.В., Башашкина Е.В., Суясов Н.А. Интенсификация процесса биоконверсии отходов пищевой промышленности в дрожжевую биомассу кормового назначения // *Химическая промышленность сегодня*. – 2010. – № 8. – С. 10–15.
2. Суясов Н.А., Горлова Е.Н., Шакир И.В., Панфилов В.И. Повышение эффективности биодеструкции жиросодержащих отходов посредством воздействия стрессовых факторов на культуры микроорганизмов // *Труды X международной конференции Окружающая среда для нас и будущих поколений. Самарский ГТУ Самара*. – 2005. – С. 139–139.
3. Миняева Д.А., Йиганг Ф., Калёнов С.В., Вакар Л.Л. Адаптация к оксидативному стрессу как способ повышения активности бактериальных антагонистов автотрофных микроорганизмов, ухудшающих очистку сточных вод. // *Вода: химия и экология*. – 2014. – Т. 73, № 7. – С. 29–35.
4. Червякова О.П., Шакир И.В., Суясов Н.А., Панфилов В.И. Факторы, влияющие на биосинтез каротиноидов дрожжами *Rhodotorula rubra*. // *Химическая промышленность сегодня*. – 2015. – № 5. – С. 45–50.
5. Червякова О.П., Шакир И.В., Панфилов В.И., Кузнецов А.Е., Суясов Н.А. Способ получения биомассы каротинсинтезирующих микроорганизмов. // *Патент России № 2553213*. 2015. Бюл. № 16.

UDC 579.22

## OXIDATIVE STRESS AS A METHOD OF INCREASING THE BIOSYNTHESIS OF CAROTENOIDS BY YEASTS OF THE GENUS RHODOTORULA

Chervyakova O.P., Simagina P.V., Makarova M. I., Suyasov N.A.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia  
Geroev Panfilovtsev street, 20, Russia, 125047  
e-mail: chervyakova85@mail.ru

It is shown that the introduction of hydrogen peroxide, as an agent of oxidative stress, into the deep yeast culture of the genus *Rhodotorula* leads to an increase in the biosynthesis of carotenoid pigments. At the same time, the adapted cultures, obtained as a result of repeated transplants, retain their carotene-synthesizing activity.

**Key words:** carotenoids, *Rhodotorula*, oxidative stress, hydrogen peroxide.

Yeasts of the genus *Rhodotorula* represent an interesting group of microorganisms for use in the field of biotechnology, as they are able to synthesize various carotenoid pigments having high economic value, such as  $\beta$ -carotene, toruline and torularhodin. Industrial use of these microorganisms is limited due to low pigment productivity.

To intensify the process of biosynthesis of carotenoids by the application of oxidative stress. This approach allows mobilizing adaptive resources of microorganisms at the level of stimulation of their metabolism. As a result, stress exposure microorganisms become more powerful oxidizing system which can manifest itself in the ability to consume hard digestible substrate or excess synthesis of metabolites. Thus for process intensification

bioconversion food industry waste and efficiency of biodegradation of fat-containing waste offer affect yeast cultures hydrogen peroxide [1, 2]. Adaptation to oxidative stress can enhance the positive effect obtained with a single exposure. In this way, bacterial strains of antagonists of autotrophic microorganisms, which impair the purification of sewage, were obtained with increased algicidal activity [3].

The effect of hydrogen peroxide, as an oxidative stress agent, was studied on the carotenogenesis of four yeast strains of the genus *Rhodotorula*: *Rh. rubra* Y-1354, *Rh. rubra* Y-397, *Rh. glutinis* Y-608 (Russian National Collection of Industrial Microorganisms – VKPM); *Rh. rubra* (D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Department of Biotechnology). It has been established that a single exposure to hydrogen peroxide, in an amount of 3.5 to 6.0 g/l (100% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), by introducing it into the deep yeast culture, leads to an increase in the biosynthesis of carotenoids by a factor of 1.5-2 [4]. When the stressor agent was repeatedly exposed by multiple transplants, adapted yeast cultures were obtained, in which the yield of carotenoid pigments was 3-4 times higher than the initial one. In this case, the adapted cultures retained their carotene-synthesizing activity [5].

#### References.

1. Smirnova V.D., Balakirev I.V., Bashashkina E.V., Suyasov N.A. The intensification of bioconversion of food industry wastes into yeast biomass for fodder purposes // *Chemical Industry Today*. – 2010. – № 8. – P. 10–15.
2. Suyasov N.A., Gorlova E.N., Shakir I.V., Panfilov V.I. Povyshenie ehffektivnosti biodestrukcii zhirosoderzhashchih othodov posredstvom vozdeystviya stressovyh faktorov na kul'tury mikroorganizmov // *Trudy X mezhdunarodnoj konferencii Okruzhayushchaya sreda dlya nas i budushchih pokolenij. Samarskij GTU Samara*. – 2005. – P. 139–139.
3. Minyaeva D.A., Yigang F., Kalionov S.V., Vakar L.L. Oxidative stress adaptation as an approach for increasing activity of bacterial antagonists of autotrophic microorganisms that affect wastewater treatment // *Water: chemistry and ecology*. – 2014. – T. 73, № 7. – P. 29–35.
4. Chervyakova O.P., Shakir I.V., Suyasov N.A., Panfilov V.I. Factors affecting carotenoid biosynthesis by yeast *Rhodotorula rubra* // *Chemical Industry Today*. – 2015. – № 5. – P. 45–50.
5. Chervyakova O.P., Shakir I.V., Panfilov V.I., Kuznecov A.E., Suyasov N.A. Method of obtaining biomass of carotene-synthesizing microorganisms // *Patent RU 2553213. Pub. 10.06.2015. Bull. № 16*.

УДК 637.055

## НОВЫЙ ПОДХОД К СОЗДАНИЮ АЭРИРОВАННЫХ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОЛИЗАТОВ ВТОРИЧНОГО МОЛОЧНОГО СЫРЬЯ

**Агарков А.А., Харитонов Д.В., Харитонов В.Д.**

Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия  
115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп. 7  
gnu-vnimi@yandex.ru

Создана композиция пенообразователя с повышенным содержанием белка, включающая гидролизат сыровороточных белков и концентрат молочной пахты. Подход к созданию такого пенообразователя основан на сочетании приемов мембранного концентрирования подсырной сыворотки и пахты, биокаталитической конверсии сыровороточных белков и детальном исследовании полученных концентратов для получения стойких пенных систем.

**Ключевые слова:** подсырная сыворотка, молочная пахта, аэрирование, пенообразователь, баромембранное концентрирование.

При производстве молочных продуктов образуются значительные объемы побочного сырья, такого как сыворотка и пахта. На сегодняшний день лишь 25-30% молочной сыворотки перерабатывается в РФ на пищевые и кормовые цели [1]. Для более полного вовлечения в сферу питания столь ценного, богатого белком природного продукта как молочная сыворотка и пахта, а также для выделения белков, обладающих требуемым комплексом функциональных свойств, применяют процессы баромембранного концентрирования, сепарирования и ферментативного гидролиза [2,3].

Получены зависимости изменения процесса трансмембранного концентрирования пахты молочной по сравнению с подсырной сывороткой. Выявлены наиболее рациональные параметры проведения процесса: фактор концентрирования 3,5; температура процесса (20±2)°C при достижении массовой доли белка в концентрате 10,21%.

Дальнейшие исследования по разработке композиции пенообразователя были основаны на изучении комбинаторики сывороточных гидролизатов с повышенным до 11,05% содержанием белка (КГСБ-2) и концентратов молочной пахты (БКП-УФ), поскольку была доказана в случае концентрата пахты высокая стойкость пены, а в случае сывороточного гидролизата- изначально высокая пенообразующая способность (таблица 1).

Как видно из данных таблицы 1, наилучшими пенообразующими характеристиками обладал образец №2, где сочетание КГСБ-2 и БКП-УФ составило 1:2. Несмотря на то, что с увеличением содержания в системе КГСБ-2 увеличивалась степень взбитости, тем не менее сокращалась стойкость пены.

Таблица 1. – Пенообразующие характеристики комплексного пенообразователя

Исследуемые характеристики	Соотношение КГСБ-2 и БКП-УФ				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
Степень взбитости, %	75	88	90	95	99
Стойкость пены, ч	3,4	8,0	7,5	6,3	4,0

В связи с вышеизложенным, в качестве основы для получения аэрированных систем будет использован второй образец комплексного пенообразователя. Исследования будут направлены на изучение изменения структурно-механических и физико-химических свойств продуктов при добавления в них молочно-белковых концентрированных добавок, полученных ранее и подвергнутых ферментативному гидролизу подобранными композициями ферментов.

#### Литература.

1. Володин, Д.Н. Сывороточные ингредиенты: анализ рынка и перспективы производству / Д.Н. Володин, М.С. Золотарева, В.К. Топалов, И.А. Евдокимов, А.Г. Храмцов, Б.В. Чабалин, Л. Нейедлы // Молочная промышленность. – 2015. - №3. - С. 54-56.
2. Королева, О.В. Функциональные свойства кисломолочных продуктов с гидролизатами сывороточных белков / О.В. Королева, Е.Ю. Агаркова, С.Г. Ботина, И.В. Николаев, Н.В. Пономарева, Е.И. Мельникова, В.Д. Харитонов, А.Ю. Просеков, А.Г. Кручинин, М.В. Крохмаль, К.А. Березкина, И.В. Рожкова, Е.А. Юрова, Н.А. Жижин // Молочная промышленность. – Москва. – 2013. – №11. – С.52-55.
3. Ajonu, R. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: influence of pre-treatment and enzyme specificity / R. Ajonu, G. Doran, P. Torley, S. Agbooda / Food Chem. – 2013. – Vol. 136. – P. 1435-1443.

UDC 637.055

## NEW APPROACH TO THE CREATION OF AERATED MILK PRODUCTS ON THE BASIS OF THE SECONDARY MILK RAW MATERIALS

Agarkov A.A., Kharitonov D.V., Kharitonov. V.D

The Federal State Budget Institution "All-Russian Dairy Research Institute", Moscow, Russia, Lusinovskaya 35, build. 7  
gnu-vnimi@yandex.ru

Foaming agent composition with increased protein content including whey protein hydrolysate and buttermilk concentrate has been created. The approach to the creation of such foaming agent is based on the combination of whey and buttermilk concentration method, biocatalytic conversion of whey proteins and detailed study of the obtained concentrates for stable foam systems production.

**Key words:** whey , buttermilk, aeration, foaming agent, barometric concentration

In the process of dairy products manufacture large volumes of secondary raw materials, e.g. whey and buttermilk are formed. Nowadays only 25-30% of milk whey is processed in RF food and forage purposes [1]. In order to involve such valuable rich in protein nature product as milk whey and buttermilk in the sphere of nutrition as well as for isolation of proteins possessing the required complex of functional properties the processes of baromembrane concentration and fermentative hydrolysis are used [2,3].

The dependences of the change of milk buttermilk transmembrane concentration process comparing to cheese whey have been obtained. The most rational parameters of the process realization: concentration factor – 3,5; the process temperature ( 20 + - 2oC) at protein mass fraction 10,21%.

The further investigations aimed at the development of foaming agent composition were based on study of



combinatorics of whey hydrolysates with increased up to 11.05% of protein content ( CHWP-2) and milk buttermilk concentrates (PCB-UF) since high foam stability was proved in case of buttermilk concentrate but in case of whey hydrolysate – initially high foam forming capacity (Table 1).

Data of Table 1 show that sample No.2 possessed the best foam forming characteristics where the combination of CHWP-2 and PCB-UF made up 1:2. In spite of the fact that with the increased content of CHWP-2 the whipping grade was increased but meanwhile the foam stability was decreased.

Table 1- Foam forming characteristics of the foaming agent

Studied characteristics	Ratio of CHWP-2 and PCB-UF				
	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5
Degree of whipping, %	75	88	90	95	99
Stability of foam, h	3, 4	8,0	7,5	6,3	4,0

In connection therewith the second sample of the complex foam agent will be used as the basis for obtainment of aerated systems. The investigations will be aimed at study at changes of the product structural-mechanical and physical-chemical properties under addition of milk protein concentrated additives in them obtained earlier and subjected to fermentative hydrolysis by the selected ferment compositions

References:

1. Volodin D.N. *Whey ingredients: market analysis and perspective of the production*/ D.N. Volodin, M.S. Zolotareva, V.K. Topalov, I.A. Evdokimov, A.G. Chramtsov, B.V. Chabalin, L.Neyedly// *Milk Industry*. -2015. - No.3.-P.54-56
2. Koroleva O.V. *Functional properties of fermented dairy products with whey proteins hydrolysates* / O.V.Koroleva, E.Yu.Agarkova, S.G.Botina, I.V.Nikolaev, N.V.Ponomareva, E.I.Melnikova, V.D.Kgharitonov, A.Yu.Prosekov, A.G.Krutchinin, M.V.Krohmal, K.A.Berezkina, I.V.Rozhkova, E.A.Yurova, N.A.Zhizhin// *Milk Industry*. – Moscow.- 2013. – No11. – P.52-55
3. Ajunu, R. *Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: influence of pre-treatment and enzyme specificity* / R. Ajonu, G. Doran, P.Torley, S. Agbooda / *Food Chem.* – 2013. – Vol. 136. – P. 1435-1443

УДК 637.05:633.11:613.292

## ОСНОВЫ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА АЛЛЕРГЕННЫХ БЕЛКОВ В ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

**Борщева Ю.А., Курбатова Е.И., Соколова Е.Н., Фурсова Н.А., Римарева Л.В., Дыдыкин А.С.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия  
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д.4-Б,  
e-mail: juliyaborshova@yandex.ru*

Изучено биокаталитическое воздействие протеолитических ферментов микробного происхождения на аллергенные белки мяса говядины и пшеницы. Показано, что для эффективного гидролиза аллергенных белковых фракций необходимо использовать комплекс пептидаз и протеиназ.

**Ключевые слова:** пищевая аллергия, бычий сывороточный альбумин, глютен, ферментные препараты, протеолиз, гипоаллергенные гидролизаты.

Индивидуальная белковая непереносимость на сегодняшний день является проблемой, которую невозможно игнорировать. Особенно остро данный вопрос стоит в отношении детского питания, так как присутствие в пище некоторых белков могут оказывать негативное воздействие на организм ребенка. Источником таких белков являются продукты, имеющие молочную, зерновую или мясную основу. При этом иммунная система идентифицирует эти соединения как чужеродные и в организме происходит выработка антител.

Принято считать, что взрослый человек менее подвержен пищевой аллергии, особенно в отношении мясных, зерновых и мучных продуктов питания. Однако в современных условиях наблюдается тенденция к росту числа людей с диагнозом глютеновая энтеропатия (10%), либо с аллергией на животные белки (3-15%). При этом антигенное сродство продуктов животного происхождения, таких как молоко и мясо приводит к перекрестной реактивности и повышает риск аллергической реакции.

Получение гипоаллергенных гидролизатов и создание продуктов питания со сниженной аллергенностью в первую очередь обеспечивает безопасность и улучшает качество жизни людей подверженных пищевой аллергии.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – один из основных аллергенов мясного сырья. Для него характерна компактная глобулярная структура, определяющая относительную устойчивость к протеолизу, особенно к действию различных эндопептидаз в нейтральных и щелочных средах.

Из аллергенов зерновых, особое внимание уделяется пшеничной клейковине или глютену. Иммуногенность глютена связана с его составом, богатым глутамином и пролином, что дает ему высокую сопротивляемость к разложению пепсином при пищеварении. Высвобождение таких полипептидов в желудочно-кишечном тракте приводит к иммунному ответу организма.

Электрофоретическое исследование нативных белков мяса говядины и пшеничной цельнозерновой муки показало значительное количество аллергенных фракций (БСА - 68-69 кДа, проламины 36-136 кДа).

На основании экспериментальных данных по исследованию влияния ряда ферментных препаратов микробного происхождения на структуру и свойства аллергенных белков, показаны различия в степени гидролиза как фракции БСА, так и глиадинов и глютелинов пшеницы.

По результатам исследований установлено, что для значительной биотрансформации животных и растительных белков обладающих антигенной активностью целесообразно применение ферментного препарата, содержащего в своем составе комплекс пептидаз и протеиназ. Это позволит получать гидролизаты с заданным пептидным составом, а также иммунохимическими свойствами как компонентов для продуктов специализированного питания.

#### Литература:

1. Лусс Л.В. Пищевые аллергены и пищевые добавки: роль в формировании пищевой аллергии и пищевой непереносимости // Эффективная фармакотерапия. Аллергология и иммунология. – 2014. - Т.33, №2. – С.12-18.
2. Адаева-Янаева, Х.А., Муслимова З.А., Мачарадзе Д.Ш. Аллергия на мясо. Клинические случаи // Лечащий врач. – 2015. -№ 4. – С. 10.
3. Дыдыкин А.С., Губина А.А., Курбатова Е.И. Гипоаллергенные продукты на мясной основе для детей раннего возраста // Мясные технологии. - 2015. - № 6 (150). - С. 38-41.
4. Kolpakova V.V., Chumikina L.V., Arabova L.I., Lukin D.N., Topunov A.F., Titov E.I. Functional technological properties and electrophoretic composition of modified wheat gluten // Foods and Raw Materials. 2016. Vol. 4. № 2. P. 48-57.
5. Savvateeva LV, Zamyatnin AA. Prospects of Developing Medicinal Therapeutic Strategies and Pharmaceutical Design for Effective Gluten Intolerance Treatment // Current Pharmaceutical Design. 2016. Vol. 22. № 16. P. 2439-2449.

UDC 637.05:633.11:613.292

## FUNDAMENTALS OF BIOCATALYTIC EFFECT ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES OF ALLERGENIC PROTEINS IN FOODS OF ANIMAL AND PLANT ORIGIN

**Borshcheva Yu.A., Kurbatova E.I., Sokolova E.N., Fursova N.A., Rimareva L.V., Dydykin A.S.**

All-Russian research Institute of food biotechnology is a branch of Federal state budget institution of science "Federal research center of food, biotechnology and food safety", Moscow, Russia  
111033, Moscow, str. Samokatnaya, 4-B  
e-mail: juliyaborshova@yandex.ru

The effect of proteolytic enzymes of fungal origin on allergenic proteins in beef meat and wheat has been studied. It is shown that for the effective hydrolysis of allergenic protein fractions, it is necessary to use a complex of peptidases and proteinases.

**Key words:** food allergy, bovine serum albumin, gluten, enzyme preparations, proteolysis, hypoallergenic hydroizatites.

Individual protein intolerance today is a problem that cannot be ignored. This problem is especially acute in relation to infant food, because the presence of certain proteins in food can have a negative impact on the baby's body. This problem is especially acute in relation to baby food, as some proteins in the child's diet can cause an immune response. In this case the immune system identifies these compounds as foreign and the body produces antibodies.

It is generally believed that an adult is less susceptible to food allergies, especially in relation to meat, cereals and baked foods. However, in modern conditions there is a tendency to increase the number of people diagnosed with gluten enteropathy (10%), or allergies to animal proteins (3-15%). In this case, the antigenic affinity products of animal origin, such as milk and meat, leads to cross reactivity and increases the risk of an allergic reaction.

Obtaining hypoallergenic hydrolysates and creating food with reduced allergenicity primarily provides safety and improves the quality of life for people with food allergies.

Bovine serum albumin (BSA) is one of the main allergens in meat raw materials. It is characterized by a compact globular structure that determines the relative resistance to proteolysis, especially to the action of various endopeptidases in neutral and alkaline media.

Among the cereal allergens, particular attention has wheat gluten. The immunogenicity of gluten is associated with its composition, rich in glutamine and proline, which gives it a high resistance to degradation by pepsin during digestion. The release of such polypeptides in the gastrointestinal tract leads to an immune response of the body.

Electrophoretic study of native beef meat proteins and whole wheat flour showed a significant amount of allergenic fractions (BSA - 68-69 kDa, prolamines 36-136 kDa).

Based on experimental data on the effect number enzyme preparations of microbial origin on the structure and properties of allergenic proteins, differences in the degree of hydrolysis of both the BSA fraction and the gliadins and glutelins of wheat are shown.

According to the results of the research, it was found that for the significant biotransformation of animals and plant proteins with antigenic activity, it is expedient to use an enzyme preparation containing a complex of peptidases and proteinases. This will allow to obtain hydrolysates with the desired peptide composition and immunochemical properties as components for specialized food products.

*References:*

1. Luss L.V. *Food allergens and food additives: the role in the development of food allergy and food intolerance // Effective pharmacotherapy. Allergology and Immunology. 2014. Vol. 33. № 2. P. 12-18.*
2. Aдаева-Янаева H.A., Muslimova Z.A., Macharadze D.S. *Meat allergy. Clinical cases // The attending physician. 2015. № 4. P. 10-14.*
3. Dыдыкин A.S., Gубина A.A., Kурбатова E.I. *Gипоаллергенные продукты на мясной основе для детей раннего возраста // Meat Technology. 2015. № 6 (150). P. 38-41.*
4. Kолпакова V.V., Чумикина L.V., Арабова L.I., Лукин D.N., Топунов A.F., Титов E.I. *Functional technological properties and electrophoretic composition of modified wheat gluten // Foods and Raw Materials. 2016. Vol. 4. № 2. P. 48-57.*
5. Савватеева LV, Замыатнин AA. *Prospects of Developing Medicinal Therapeutic Strategies and Pharmaceutical Design for Effective Gluten Intolerance Treatment // Current Pharmaceutical Design. 2016. Vol. 22. № 16. P. 2439-2449.*

УДК 663.5

## **ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ РЕЦЕПТУР НОВЫХ ВИДОВ ВОДОК С ЦЕЛЬЮ СНИЖЕНИЯ ИХ ТОКСИЧНОСТИ**

**Абрамова И.М., Головачёва Н.Е., Поляков В.А., Морозова С.С., Калинина А.Г.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии - филиал «Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия  
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д. 4Б  
e-mail: golovacheva.otlvp@mail.ru*

Исследовано влияние комплексных пищевых добавок «Медовик» и «Овсянник» на органолептические, физико-химические показатели, катионный, анионный состав водки. Установлено, что включение добавок в состав изделий привело к улучшению органолептических показателей и смягчению тяжести абстинентного синдрома после форсированной алкогольной интоксикации и к более интенсивному снижению его проявления.

**Ключевые слова:** комплексная пищевая добавка, водка, водно-спиртовая смесь, щелочность, массовая концентрация, катионы, анионы, органолептические показатели, форсированная алкоголизация, абстинентный синдром.

Одним из самых простых способов решения проблемы качества и безопасности водки, является включение в состав водок максимально безопасных ингредиентов, с точки зрения их влияния на токсические эффекты этилового спирта. Известно, что некоторые ингредиенты, разрешенные к применению, способны увеличивать токсические эффекты этилового спирта, тем самым, повышая токсичность водки.

Другим способом влияния на проблему токсичности водок является использование специальных технологий или рецептурных ингредиентов, позволяющих снижать токсические эффекты этилового спирта.

Тщательный выбор рецептурных ингредиентов для новых водок является весьма серьезным вопросом, который в конечном итоге влияет, как на качество производимой водки, так и на снижение ее токсичности.

Проведены исследования влияния новых пищевых ингредиентов, нашедших применение в производстве ликероводочных изделий, на примере комплексных пищевых добавок «Медовик» и «Овсянник». Изучены органолептические, физико-химические показатели, катионный, анионный состав водно-спиртовой смеси крепостью 40%, приготовленной на спирте «Люкс» и специально подготовленной воде (сортировки), а также физиологическое воздействие названных добавок в ее составе на организм в опыте *in vivo*.

Основными ингредиентами комплексных пищевых добавок «Медовик» и «Овсянник», соответствующих требованиям ТР ТС 029/2012 и ТР ТС 021/2011 являются настои меда и овса, приготовленные по особой технологии, и углеводы: фруктоза и лактоза.

На основании приведенных исследований установлено:

- в водно-спиртовой смеси с исследуемыми ингредиентами увеличивалась массовая концентрация уксусного альдегида, но при этом её значение не превысило предельно допустимую величину для водок, приготовленных на спирте «Люкс» (3 мг/ дм<sup>3</sup> в пересчете на

- 1 дм<sup>3</sup> безводного спирта). Массовая концентрация 2-пропанола и объемная доля метилового спирта в водках с добавлением ингредиентов не изменялась;

- при добавлении в водно-спиртовую смесь комплексных пищевых добавок незначительно снижались щелочность и величина рН. Массовая концентрация катионов и анионов не изменялась, за исключением натрия и калия, количество которых увеличивалось при внесении добавок, но не изменялось в процессе хранения;

- дегустационные оценки водок улучшились на 0,2-0,22 балла, что, очевидно, вызвано увеличением содержания натрия, который в гидрокарбонатной форме смягчает вкус водки и уменьшает ее жгучесть;

- за время внутрижелудочного введения животным исследуемых образцов гибель животных была минимальна при введении водно-спиртовой смеси с комплексной пищевой добавкой «Медовик» - 13,3% и одинакова в случае исходной сортировки и водно-спиртовой смеси, содержащей комплексную пищевую добавку «Овсянник» - по 20% в каждой. Это позволяет предположить, что добавка «Медовик» в условиях эксперимента снижала проявление токсичности этилового спирта;

- добавление в исходную сортировку комплексных пищевых добавок «Медовик» и «Овсянник» приводят к смягчению тяжести абстинентного синдрома после форсированной алкогольной интоксикации и к более интенсивному снижению его проявления.

#### Литература:

1. Поляков В.А., Абрамова И.М., Медриш М.Э. Выпуск токсически безопасной водки – главная задача современного производства алкогольной продукции//Пищевая промышленность. – 2012. - № 9. - с.46-47.
2. Поляков В.А., Абрамова И.М., Морозова С.С., Шубина Н.А. Комплексные пищевые добавки в технологии приготовления водок//Вопросы питания. - 2016. – Т. 85. - № 2. – С. 146.
3. Абрамова И.М., Поляков В.А., Медриш М.Э., Павленко С.В. Значение ионного состава водок в контроле алкогольной продукции//Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2013. - № 2. - С.20-21.
4. ГОСТ Р 51821-2001. Водки и водки особые. Метод определения массовой концентрации катионов калия, натрия, аммония, кальция, магния, стронция и анионов фторидов, хлоридов, нитратов, нитритов, фосфатов и сульфатов с применением ионной хроматографии.
5. ГОСТ 30536-2013. Водка и спирт этиловый из пищевого сырья. Газохроматографический экспресс- метод определения содержания токсичных микропримесей.
6. ГОСТ 32035-2013. Водки и водки особые. Правила приемки и методы анализа.
7. СТО 00334586-3-02-2014. Водки и водки особые и технологическая вода для их приготовления. Методы определения массовой концентрации железа и анионов.
8. ГОСТ Р 55313-2012. Спирт этиловый из пищевого сырья, водки и изделия ликероводочные. Методы органолептического анализа.
9. Нужный В.П. Методологические аспекты оценки токсичности спиртосодержащих жидкостей и алкогольных напитков//Токсикологический вестник. – 1999. - № 4. - с. 2-10.
10. Нужный В.П., Суркова Л.А., Листвина В.П. Сравнительное экспериментальное исследование острого и подострого токсического действия коньяка и виски// Наркология. – 2002, -№10, - С. 46-52.

11. Нужный В.П. Снижение токсичности алкогольных напитков: достижения и перспективы // *Современные ресурсо- и энергосберегающие технологии в спиртовой и ликеро-водочной промышленности. Тезисы докладов 2-го съезда токсикологов России.* - Москва, 2003. - С. 160-161.

12. Нужный В.П., Демешина И.В., Забирова И.Г., Листвина В.П., Самойлик Л.В., Суркова Л.А. и Тезиков Е.Б. Влияние компонентов сивушного масла и эфиральдегидной фракции на острую токсичность и наркотическое действие этилового спирта//*Токсикологический вестник.* - 1999. - № 2. - С. 2-8.

UDC 663.5

## TO ASSESS THE POSSIBILITY OF APPLICATION OF COMPLEX FOOD ADDITIVES WHEN DESIGNING FORMULATIONS FOR NEW TYPES OF VODKAS TO REDUCE THEIR TOXICITY

**Abramova I.M., Golovacheva N.E., Polyakov V.A., Morozova S.S., Kalinina A.G.**

*Russian Research Institute of Food Biotechnology is a Branch of the Federal Research Center of Food, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia*

*111033, Moscow, Samokatnaya st., h. 4B*

*e-mail: golovacheva.otlvp@mail.ru*

**Key words:** A complex food additive, vodka, aqueous-alcoholic mixture, alkalinity, mass concentration, cations, anions, organoleptic characteristics, forced alcoholization, withdrawal syndrome.

The effect of complex food additives "Medovik" and "Ovsyannik" on the organoleptic, physicochemical parameters, cationic, anionic composition of vodka was studied. It was found that the inclusion of additives in the composition of products led to an improvement in organoleptic indices and alleviation of the severity of the withdrawal syndrome after forced alcohol intoxication and to a more intensive decrease in its manifestation.

One of the easiest ways to solve the problem of quality and safety of vodka, is the inclusion of vodka in the safest possible ingredients, from the point of view of their influence on the toxic effects of ethanol. It is known that some of the ingredients permitted for use, may increase the toxic effects of ethanol, thereby increasing the toxicity of vodka.

Another way to influence the problem of toxicity of vodka is the use of specific technologies or prescribed ingredients to reduce the toxic effects of ethanol.

Careful selection of recipe ingredients for the new vodka is a very serious issue which ultimately impacts on the quality of produced vodka, and reduction of toxicity.

The effect of new food ingredients, which was used in the production of alcoholic beverages, for example, complex food additives "Medovik" and "Ovsyannik". Studied organoleptic, physico-chemical properties, cationic, anionic composition of water-alcohol mixture strength of 40%, prepared on alcohol "Lux" and specially prepared water (sorting), as well as physiological effects called additives in its composition on the body in experience in vivo.

The main ingredients of a complex food additives "Medovik" and "Ovsyannik" that meet the requirements of TR CU 029/2012 and TR CU 021/2011 are infusions of honey and oats, cooked in a special process, and carbohydrates: fructose and lactose.

On the basis of these researches:

- in aqueous-alcoholic mixture with the researched ingredients increased mass concentration of acetaldehyde, but its value has not exceeded the maximum allowable size for vodka, prepared on alcohol "Lux" (3 mg/ dm<sup>3</sup> in terms of 1 dm<sup>3</sup> of anhydrous alcohol). Mass concentration of 2-propanol and the volume fraction of methyl alcohol in the vodka with the addition of ingredients has not changed;

- when added to aqueous alcoholic liquid complex food additives slightly decreased the alkalinity and the pH. Mass concentration of cations and anions have not changed, with the exception of sodium and potassium, whose number increased with the introduction of additives, but was not altered during storage;

- tasting vodka rating has improved by 0.2-0.22 points, which is obviously caused by the increase in the content of sodium bicarbonate in the form of softens the taste of vodka and reduces its pungency;

- during intragastric administration to animals of the studied samples the death of the animals was minimal during the introduction of water-alcohol mixture with complex food additive "Medovik" - 13.3% and same in the case of initial sorting and water-alcohol mixture containing the complex food additive "Ovsyannik" - 20% each. This suggests that the Supplement "cake" in the experiment reduced the expression of the toxicity of ethyl alcohol;

- adding to the initial sorting of complex food additives "Medovik" and "Ovsyannik" lead to the mitigation of the severity of the withdrawal syndrome after forced alcohol intoxication and a more intense reduction of its

manifestations.

References:

1. Poljakov V.A., Abramova I.M., Medrish M.Je. Vypusk toksicheski bezopasnoj vodki – glavnaja zadacha sovremennogo proizvodstva alkogol'noj produkcii //Pishhevaja promyshlennost'. – 2012. - № 9. - p.46-47.
2. Poljakov V.A., Abramova I.M., Morozova S.S., Shubina N.A. Kompleksny epishhevye dobavki v tehnologii prigotovlenija vodok // Voprosy pitaniya. – 2016. – T.85. - № 2. – P. 146
3. Abramova I.M., Poljakov V.A., Medrish M.Je, Pavlenko S.V. Znachenie ionnogo sostava vodok v kontrole alkogol'noj produkcii // Proizvodstvo spirta i likerovodochnyh iz-delij. – 2013. - № 2. - P.20-21.
4. GOST R 51821-2001. Vodki i vodki osobye. Metod opredelenija massovoj koncentracii kationov kalija, natrija, ammonija, kal'cija, magnija, stroncija i anionov fluoridov, hloridov, nitratov, nitritov, fosfatov i sul'fatov s primeneniem ionnoj hromatogra-fii.
5. GOST 30536-2013. Vodka i spirt jetilovyj iz pishhevogo syr'ja. Gazohromatografiche-skij jekspress- metod opredelenija sodержanija toksichnyh mikroprimesej.
6. GOST 32035-2013. Vodki i vodki osobye. Pravila priemki i metody analiza.
7. STO 00334586-3-02-2014. Vodki i vodki osobye i tehnologicheskaja voda dlja ih prigo-tovlenija. Metody opredelenija massovoj koncentracii zheleza i anionov.
8. GOST R 55313-2012. Spirt jetilovyj iz pishhevogo syr'ja, vodki i izdelija likerovodoch-nye. Metody organolepticheskogo analiza.
9. Nuzhnyj V.P. Metodologicheskie aspekty ocenki toksichnosti spirtosoderzhashhijh zhid-kostej i alkogol'nyh napitkov//Toksikologicheskij vestnik. – 1999. - № 4. - P. 2-10.
10. Nuzhnyj V.P., Surkova L.A., Listvina V.P. Sravnitel'noe jeksperimental'noe issledo-vanie ostrogo i podostrogo toksicheskogo dejstvija kon'jaka i viski// Narkologija. – 2002/-№10/ - P. 46-52.
11. Nuzhnyj V.P. Snizhenie toksichnosti alkogol'nyh napitkov: dostizhenija i perspekti-vy//Sovremennye resurso- i jenergosberegajushhie tehnologii v spirtovoj i likero-vodochnoj promyshlennosti. Tez.dokl. 2-go siezda toksikologov Rossii. – Moscow. – 2003. – P. 160-161.
12. Nuzhnyj V.P., Demeshina I.V., Zabirowa I.G., Listvina V.P., Samojlik L.V., Surkova L.A., Tezikov E.B. Vlijanie komponentov sivushnogo masla i jefiroal'degidnoj frakcii na ostruju tok-sichnost' i narkoticheskoe dejstvie jetilovogo spirta//Toksiko-logicheskij vestnik. – 1999. - № 2. - P. 2-8.

УДК 573.7+ 579.017.7

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОМАССЫ ЛИЧИНОК МУХИ ЧЕРНАЯ ЛЬВИНКА HERMETIA ILLUCENS В КОРМОВЫХ(ПИЩЕВЫХ) ЦЕЛЯХ

Ушакова Н.А., Бастраков А.И.

ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН, Москва, Россия  
119071 Москва, Ленинский пр., д.33  
e-mail: naushakova@gmail.com

Процесс био конверсии нестерильных органических(пищевых) субстратов при развитии в их массе личинок *Hermetia illucens* совмещает микробное аэробное компостирование и пищеварение личинок, использование субстрат в качестве корма. Выделены четыре стадии, характеризующиеся изменениями температуры реакционной массы. Биомасса личинок является источником белка, жира, биологически активных веществ.

**Ключевые слова:** органические (пищевые) отходы, личинки, муха черная львинка, белок, жир

Утилизация органических, в том числе, пищевых отходов требует решения комплекса технологических, экологических и экономических проблем. Ежедневно в качестве пищевых отходов выбрасывается до трети объема произведенных продуктов, большая часть из которых растительного происхождения (остатки фруктов и овощей). Это связано со сложностью их хранения и транспортировки. Продукты быстро разлагаются и становятся непригодными для дальнейшего использования. Одним из эффективных методов утилизации в настоящее время является биологическая переработка сырья. Во всем мире активно развиваются технологии биоутилизации с помощью личинок мухи черная львинка *Hermetia illucens*, которые используют различные органические отходы в качестве кормовых субстратов [1 2].

Процесс био конверсии нестерильных органических субстратов при развитии личинок *H.illucens* – комплексный, включающий совместную микробную активность и пищеварительную деятельность личинок, развивающихся в массе нестерильного субстрата. Выделены четыре стадии, характеризующиеся изменениями температуры реакционной массы (рисунок): в начале процесса 1 – задержка изменения тем-

пературы (лаг-фаза); 2 – подъем температуры (разогрев), 3 – стационарная конверсия при повышенной температуре, 4 – резкое падение температуры до температуры воздуха окружающей среды (охлаждение, или завершающая стадия). Процесс сопровождается редукцией кормового субстрата, накоплением биомассы подрастающих личинок, а также выделением газов (углекислый газ, аммиак, летучие метаболиты, пары воды). Полученная биомасса личинок зависит от состава кормового субстрата и содержит 36-45% протеина, 20-45% жира, 6-8% хитина, 3-14% сахаров, 3-7% золы, до 4,7 г/кг Са, 3,9 г/кг Р. В составе аминокислот содержатся все незаменимые аминокислоты, в липидной фракции доминирует лауриновая кислота (38%), присутствует иммуноактивный моноглицерид лауриновой кислоты. Основные стерины - фитостерины ( $\alpha$ -ситостерин и стигмастерин). Холестерин не более 10% от всех стеринов.

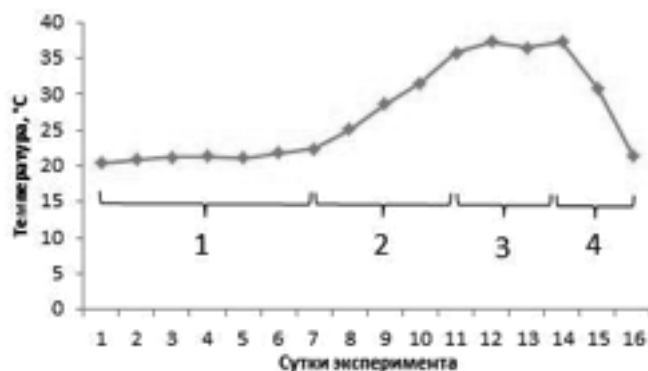


Рисунок. Изменение температуры массы некондиционного зерна кукурузы при развитии личинок *Hermetia illucens*

Литература:

1. Čičková H., Newton G. L., Lacy R. C., Kozánek M. The use of fly larvae for organic waste treatment // *Waste Manag.*, 2015. – V. 35. – P. 68 – 80.
2. Kalová M., Borkovcová M. Voracious larvae *Hermetia illucens* and treatment of selected types of biodegradable waste // *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2013. –LXI. No.1. – P. 77 – 83.

УДК 573.7+ 579.017.7

## PROSPECTS FOR USING THE BIOMASS OF THE LARVAE OF THE BLACK SOLDIER FLY HERMETIA ILLUCENS FOR FODDER (FOOD) PURPOSES

Ushakova N.A., Bastrakov A.I.

FGBUN A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Moscow, Russia  
119071 Moscow, Leninsky Prospekt, d.33  
e-mail: naushakova@gmail.com

The process of bioconversion of non-sterile organic (food) substrates with the development in their mass of larvae *Hermetia illucens* combines microbial aerobic composting and digestion of larvae using the substrate as a feed. Four stages are distinguished, characterized by changes in the temperature of the reaction mass. Biomass of larvae is a source of protein, fat, biologically active substances.

**Key words:** organic (food) waste, larvae, black soldier fly, protein, fat

Utilization of organic, including food waste, requires the solution of a complex of technological, environmental and economic problems. Daily as a food waste is thrown up to a third of the volume of products produced, most of which are of plant origin (fruit and vegetable residues). This is due to the complexity of their storage and transportation. Products quickly decompose and become unsuitable for further use. One of the most effective methods of utilization at present is the biological processing of raw materials. Biotechnology technologies are actively developing all over the world with the help of the black soldier fly *Hermetia illucens*, which use various organic wastes as feed substrates [1 2].

The process of bioconversion of non-sterile organic substrates in the development of *H.illucens* larvae is

complex, including joint microbial activity and digestive activity of larvae developing in the mass of the non-sterile substrate. In the development of larvae of the black soldier fly on organic substrates, four stages are distinguished, characterized by changes in the temperature of the reaction mass (Fig.): At the beginning of the process 1 - delay in temperature change (lag phase); 2 - temperature rise (warming up), 3 - stationary conversion at elevated temperature, 4 - sudden temperature drop to ambient air temperature (cooling, or finishing stage). The process is accompanied by the reduction of the feed substrate, the accumulation of biomass of the growing larvae, and the release of gases (carbon dioxide, ammonia, volatile metabolites, water vapor). The resulting biomass of the larvae depends on the composition of the feed substrate and contains 36-45% protein, 20-45% fat, 6-8% chitin, 3-14% sugars, 3-7% ash, 4.7 g / kg Ca, 3.9 g / kg P. The amino acids contain all essential amino acids, the lipid fraction is dominated by lauric acid (38%), immunoactive lauric acid monoglyceride is present. The main sterols are phytosterols ( $\alpha$ -sitosterol and stigmasterol). Cholesterol is not more than 10% of all sterols.

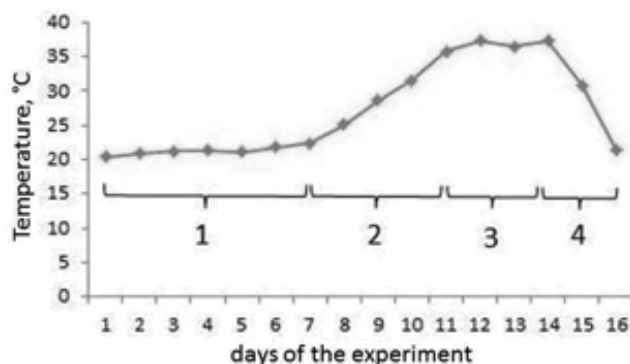


Fig. Change in the temperature of the weight of substandard corn grain in the development of larvae *Hermetia illucens*

References:

1. Čičková H., Newton G. L., Lacy R. C., Kozánek M. The use of fly larvae for organic waste treatment // *Waste Manag.*, 2015. – V. 35. – P. 68 – 80.
2. Kalová M., Borkovcová M. Voracious larvae *Hermetia illucens* and treatment of selected types of biodegradable waste // *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2013. – LXI. No. 1. – P. 77 – 83.

УДК 606:663.051

## ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПЕПТИДОВ МОЛОКА, ОБЛАДАЮЩИХ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИМИ СВОЙСТВАМИ

Гарбуз С.А., Забодалова Л.А.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»  
г. Санкт-Петербург, Россия;  
Cboma@bk.ru

В работе исследуются методы получения биологически активных пептидов молока, обладающих различным спектром биологических активностей, в том числе антиоксидантной.

**Ключевые слова:** пептиды молока, биологически активные пептиды, антиоксидантные пептиды

Цель работы получение биологически активных пептидов методом гидролиза молочных белков.

В проекте были поставлены и решены следующие задачи:

В результате проведенных экспериментов был выбран оптимум температуры фермента, наличие перемешивания и время. Данные, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Оптимизация времени гидролиза

№ опыта	Время, ч	Перемешивание	Результат, у.е.
1	12	-	100



2	12	+	120
3	24	+	135
4	36	+	138

Согласно таблице 1, наибольший выход пептидов достигается при перемешивании, что объясняется более частными контактами белка и фермента, температуре 43 градуса, что соответствует оптимуму работы протелитических ферментов представленных в ферментативном препарате Панкреатин. С оптимальным временем гидролиза 24 часа.

Для выделения пептидной фракции можно применять несколько методик, но наиболее простая и доступная, а также широко встречающаяся в литературе это гель-хроматография. В качестве носителя для гель-хроматографии мы используем sephadex g-25 с размером пор, задерживающим пептиды, массой от 3 до 20кДа. Первоначально нами была собрана аналитическая колонка высотой 15см, с соотношением высоты к диаметру 1к30, что является достаточным для аналитического разделения согласно литературе. Однако, на такой колонке наблюдалось перекрытие фракций из-за низкой высоты колонки. Данная проблема была решена использованием большей колонки высотой 50см, с соотношением высоты к диаметру 1к50. На этой колонке разделение 10мл происходит порядка 8 часов, однако на ней не наблюдается перекрытия пиков.

В результате применения гель-хроматографии нами были получены пептиды, длиной от 3 до 20 аминокислотных остатков, но из-за большого соотношения высота к диаметру колонки разделения происходило достаточно длительное время. Нами было принято решение оптимизировать и этот процесс. С помощью литературы нами была подобрана коммерчески доступная колонка Vivaspin 20, объемом 5мл, в результате центрифугирования которой нам удалось выделить пептиды размером 3-25 АК в течении 30 минут.

Таким образом, нам удалось не только выделить пептиды, но и уменьшить время их выделения в 16 раз.

В результате экспериментов был оптимизирован процесс гидролиза молочного белка. Подобраны оптимальные условия для гидролиза Панкреатином белков молока, оптимальная температура и время. Получена искомая фракция пептидов, обладающая различными биологически активными функциями, а метод их выделения был ускорен в 16 раз. Также были получены данные по активности стимуляции иммунной системы, а также была получена биологически активная фракция пептидов, обладающих антиоксидантным действием.

UDC 606: 663.051

## OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE MILK PEPTIDES WITH IMMUNITY-EMULATORY PROPERTIES

**Garbuz S.A., Zabadalova L.A.**

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg National Research University information technologies, mechanics and optics "*

*St. Petersburg, Russia;*

*Cboma@bk.ru*

Methods of producing biologically active milk peptides possessing a different spectrum of biological activities, including antioxidant, are studied.

**Key words:** milk peptides, biologically active peptides, antioxidant peptides

The aim object of the study is to obtain biologically active peptides by the method of hydrolysis of milk proteins.

The following tasks were set and solved in the project:

As a result of the experiments, the optimal temperature of the enzyme, the presence of mixing and time were chosen. Data are presented in Table 1.

Table 1. Optimization of hydrolysis time

Nº sample	Time, h	Mixing	Result, c.u.
1	12	-	100
2	12	+	120

3	24	+	135
4	36	+	138

According to Table 1, the greatest yield of peptides is achieved with stirring, which is explained by more specific contacts of the protein and enzyme, at a temperature of 43 degrees, which corresponds to the optimum performance of the proteolytic enzymes presented in the enzyme preparation Pancreatin. With an optimum hydrolysis time of 24 hours.

Several methods can be used to isolate the peptide fraction, but the most simple and accessible, as well as widely used in the literature, is gel chromatography. As a carrier for gel chromatography, we use sephadex g-25 with a pore size that retains peptides in a mass of 3 to 20 kDa. Initially, we collected an analytical column 15cm high, with a height to diameter ratio of 1k30, which is sufficient for analytical separation according to the literature. However, on such a column overlapping of fractions was observed because of the low height of the column. This problem was solved using a larger column 50cm high, with a height to diameter ratio of 1k50. On this column the separation of 10 ml takes place on the order of 8 hours, however, no overlapping of peaks is observed on it.

As a result of the use of gel chromatography, peptides with a length of 3 to 20 amino acid residues were obtained, but because of the large ratio of the height to the diameter of the separation column, a fairly long time has occurred. We decided to optimize this process. With the help of the literature, we selected a commercially available Vivaspin 20 column, 5 ml in volume, as a result of which we were able to isolate peptides of 3-25 AK for 30 minutes.

Thus, we managed not only to isolate the peptides, but also to reduce the time of their release by 16 times.

As a result of the experiments, the process of hydrolysis of milk protein was optimized. Optimal conditions for Pancreatin hydrolysis of milk proteins, optimal temperature and time are selected. The desired fraction of peptides with different biologically active functions was obtained, and the method of their isolation was accelerated 16 times. Data were also obtained on the activity of stimulation of the immune system, and a biologically active fraction of peptides possessing an antioxidant effect was obtained.

УДК 637.146.3

## ПОЛУЧЕНИЕ НАПИТКОВ НА МОЛОЧНО-ЗЛАКОВОЙ ОСНОВЕ

Крючкова К.В., Забодалова Л.А.

Санкт-Петербургский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия  
191002 Санкт-Петербург, ул. Ломоносова д. 9,  
e-mail: kryuchkova.kira@gmail.com

Получены напитки пресный и ферментированный на основе молочно-злаковой дисперсии. Разработана рецептура и способы получения напитков.

**Ключевые слова:** дисперсия, мацерация, злаковая культура, пресный и ферментированный напитки

Внедрение в промышленность молочных продуктов с ингредиентами растительного происхождения позволяет более экономично использовать молочные ресурсы и одновременно расширяет ассортимент конкурентоспособных продуктов с привлекательными для потребителя органолептическими показателями, повышенной пищевой и биологической ценностью, обладающих функциональными свойствами.

Была разработана рецептура и технология напитков на молочно-злаковой основе и изучены их свойства.

Была получена пищевая дисперсия на основе крупы пшена шлифованного. Были подобраны в качестве экстрагентов дистиллированная вода и обезжиренное молоко; режимы экстракции крупы пшена шлифованного. На основании проведенных опытов был выбран гидромодуль 1:7(части пшена: к частям молока) при температурной обработке молочно-злаковой дисперсии  $65 \pm 2^\circ\text{C}$  при выдержке 3-5- минут.

Для сквашивания молочно-злаковой основы была выбрана закваска ацидофильной палочки, которая обладает пробиотическими свойствами и задает напитку функциональную направленность.

По совокупности показателей качества (органолептических и структурно-механических), выявлено, что для получения сквашенного продукта необходимо добавлять концентрат сывороточных белков в количестве 2,5% от массы заквашиваемой смеси, что способствует структурированию дисперсии, получению удовлетворительного сгустка (без расслоения, отстоя сыворотки), а для улучшения органолептические

ских показателей напитка рекомендовано вносить вишневый сироп, в количестве 4% от массы смеси.

При получении пресного напитка для улучшения органолептических показателей рекомендовано вносить вишневый сироп, в количестве 4% от массы смеси.

Литература:

1. Крючкова, К.В., Забодалова, Л.А. Получение пищевой дисперсии на основе зерна злаковых культур и изучение ее свойств // Сборник материалов конференции «Низкотемпературные и пищевые технологии в XXI веке». Часть II. -2015-.С.185-186
2. Крючкова, К.В. Пищевая злаковая дисперсия как рецептурный компонент напитков функционального назначения на молочной основе//Сборник тезисов докладов V конгресса молодых ученых.-2016.- с 160-162.

UDC 637.146.3

## OBTAINING BEVERAGES ON THE DAIRY-CEREAL FRAMEWORK

Kryuchkova, K.V., Zabodalova L.A  
ITMO University  
Saint-Petersburg, Russia  
191002 Saint-Petersburg, Lomonosova street, 9  
e-mail: kryuchkova.kira@gmail.com

Fresh and fermented drinks were obtained on the basis of milk-cereal dispersion. A recipe and methods for obtaining beverages have been developed.

**Key words:** dispersion, maceration, cereal culture, fresh and fermented beverages

The introduction of dairy products with ingredients of vegetable origin in the industry makes it possible to use dairy resources more economically and at the same time to expand the range of competitive products with attractive organoleptic indicators, increased food and biological value, and functional properties.

The formulation and technology of beverages on dairy-cereal basis has been developed and their properties have been studied.

Food dispersion was obtained on the basis of millet. Distilled water and skim milk were selected as extractants; regimes of extraction were chosen. The hydromodule 1: 7 (parts of millet: to parts of milk) was selected with a temperature treatment of the milk-cereal dispersion of  $65 \pm 2$  ° C for 3-5 minutes.

Starter culture was LAB (lactococcus acidophilus bacterium), which has probiotic properties and gives the drink a functional orientation.

According to the set of quality indicators (organoleptic and structural-mechanical), it was found that in order to produce a fermented product it is necessary to add whey protein concentrate in an amount of 2.5% of the weight of the fermented mixture, which facilitates the structuring of the dispersion, obtaining a satisfactory bunch (without delamination, whey), and to improve the organoleptic characteristics of the drink it is recommended to add cherry syrup, in an amount of 4% of the mass of the mixture.

It is recommended to add cherry syrup, in an amount of 4% of the mixture to a fresh beverage.

References:

1. Kryuchkova K.V., Zabodalova L.A. Obtaining food dispersion on the basis of grain cereals and the study of its properties // Collection of conference materials "Low-temperature and food technology in the XXI century." Part II. -2015-.С.185-186
2. Kryuchkova K.V., Zabodalova L.A. Obtaining food dispersion on the basis of grain cereals and the study of its properties // Annotated collection of research graduating qualification works of bachelors

УДК: 663.03:664.8.037.54

## ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БИАДЕГРАДАБЕЛЬНОГО ПИЩЕВОГО ПЛЕНОЧНОГО ПОКРЫТИЯ

**А.Д.Горневская, К.Е.Белоглазова, А.А.Ульянин, В.И.Палагин, Г.Е.Рысмухамбетова, Л.В.Карпунина**

ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Россия, 410005, Саратов, Соколова, 335, alina.gornevskaya@yandex.ru, 89271155897

Показано, что пленочное покрытие, созданное на основе лецитина, карбоксиметилцеллюлозы и ксантана,

благоприятно влияет на сохранение продуктов питания. Данное созданное пленочное покрытие обладает биодegradабельными свойствами и полностью разлагается в почве в течение семи суток.

**Ключевые слова:** биополимеры, пленочное покрытие, упаковка, пищевая промышленность, полисахариды, лецитин, ксантан, карбоксиметилцеллюлоза.

Биополимерные пленочные покрытия широко применяются в различных отраслях: пищевая промышленность, ветеринария, медицина и т.д. Использование новых биоразлагаемых компонентов в составе пленок позволяет не только уменьшить экологическую опасность, но и способствует увеличению срока хранения и повышению качества продуктов питания [1, 2]. В силу этого изобретение новых видов пищевых покрытий имеет важное научное и практическое значение.

Цель работы – изучить влияние пленочного покрытия, созданного на основе лецитина, карбоксиметилцеллюлозы и ксантана, на качество пищевых продуктов (булочки "Московская") и исследовать её биодegradабельные свойства.

В ходе исследования нами была разработана пленка из биологических компонентов - ксантана, лецитина, карбоксиметилцеллюлозы и далее изучалось её влияние на качество кондитерских изделий на примере булочки «Московская».

Мучные кондитерские образцы были выпечены по стандартной рецептуре и технологии [3]. Пленочное покрытие наносилось двукратно (до и после выпекания) и однократно после выпекания.

В процессе эксперимента нами было отмечено улучшение органолептических свойств булочки, например на поверхности продукта появлялся глянец. Также нами было отмечено улучшение структурно-механических показателей (пористость, объем и т.д.)

Кроме того нами проводились исследования о продолжительности разложения экспериментального пленочного покрытия в почве. Для этого была создана модель в лабораторных условиях. Эксперимент проходил в течение семи суток, в стандартных условиях [3]. В результате эксперимента данное пленочное покрытие полностью растворилось в почве в течение 7 суток [2].

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют говорить о положительном влиянии данного пленочного покрытия на показатели качества и сохранности мучных кондитерских изделий на примере булочки "Московская", а также данная разработка имеет ряд экологических преимуществ перед обычной упаковкой.

#### Литература:

Список использованной литературы 1. Tharanathan, R. *Biodegradable films and coatings: past, present and future* / R. Tharanathan // *Trends in Food Science and Technology*. – 2003. – Vol. 13, Is. 3. – P. 71-78. 2. Разработка пищевых упаковочных материалов из биополимеров / / К.Е. Белоглазова, Г.Е. А.Д. Горневская, А.А. Ульянин, Рысмухамбетова, Л.В. Карпунина / *Материалы V международной научно – практической конференции «Биотехнология: наука и практика» актуальная биотехнология №2 (21), 2017.* – С. 278-279. 3. Павлов А.В. *Сборник рецептур мучных кондитерских и булочных изделий для предприятий общественного питания*/ А.В. Павлов // *Сборник рецептур мучных кондитерских и булочных изделий.* – СПб: ПРОФИ-ИНФОРМ, 2004. – 296с. 4. ГОСТ 10354-82: Пленка полиэтиленовая. Технические условия.

UDC 663.03:664.8.037.54

## PRACTICAL APPLICATION OF A BIODEGRADABLE FOOD FILM COATING

**A.Gornevskaya, C.Beloglazova, A.Ulyanin, V.Palagin, G.Rysmukhambetova, L.Karpunina**

*Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Saratov, Russian Federation, Russian Federation, 410005, Saratov, Sokolovya, 335*

A film coating made on the basis of lecithin, carboxymethyl cellulose and xanthan is shown to favorably influence the preservation of food products. This created film coating has biodegradable properties and completely decomposes in the soil within seven days.

**Key words:** biopolymers, film coating, packaging, food industry, polysaccharides, lecithin, xanthan, carboxymethylcellulose.

Biopolymer-based film coatings are widely used in various industries, such as food industry, veterinary medicine, medicine, etc. The use of novel biodegradable components in such films allows not only reducing the environmental hazard, but also contributing to a prolonged shelf life and an improved quality of food products [1, 2].

Therefore, to invent new types of food coatings is of great scientific and practical importance.

The purpose of our work was to theoretically substantiate and experimentally confirm the expediency of using polysaccharides in designing film coatings for food storage. In the course of our study, we developed a film made of biological components (xanthan, lecithin, and carboxymethylcellulose) and its effect on the quality of confectionery products with the Moskovskaya™ roll as an example was studied.

Flour confectionery samples were baked according to standard recipes and technologies [3]. The film coating was applied twice (before and after baking) and once after baking.

In the course of our experiment, we noticed an improvement in the organoleptic properties of the roll, for example, gloss appeared on the product's surface. We also noted an improvement in some structural-mechanical parameters (porosity, volume, etc.)

In addition, we evaluated the duration of decomposition of our experimental film coating in the soil. For this purpose, a model was designed in laboratory conditions. The experiment was conducted during seven days, under standard conditions [3]. As a result of the experiment, the film coating completely dissolved in the soil within 7 days [2].

Thus, it can be concluded that our film coating positively influences the quality and safety of flour confectionery products, and our development has a number of environmental advantages over conventional packaging.

#### References:

*Bibliography 1. R. Tharanathan. Biodegradable films and coatings: past, present and future // Trends in Food Science and Technology. – 2003. – Vol. 13, Is. 3. – P. 71-78. 2. K.E. Beloglazova, A.D. Gornevskaya, A.A. Ulyanin, G.E. Rysmukhambetova, and L.V. Karpunina. Development of food packaging materials from biopolymers // Proc. V Int. Sci. Prac. Conf. "Biotechnology: Science and Practice". Topical biotechnology. No. 2 (21), 2017. - P. 278-279. [Russ] 3. A.V. Pavlov. Collection of recipes for flour confectionery and bakery products for public catering enterprises // Collection of recipes for flour confectionery and bakery products. - SPb: PROFI-INFORM, 2004. – 296 p. [Russ] 4. GOST 10354-82: Polyethylene film. Technical conditions.*

УДК 573.6.086.83

## ПРЕПАРАТ НА ОСНОВЕ БИОМАССЫ МИКРОМИЦЕТА MORTIERELLARETICULATA КАК СТАБИЛИЗАТОР СМЕСЕЙ ДЛЯ ВНУТРИКИШЕЧНОГО ЗОНДОВОГО ПИТАНИЯ

**Демидова Т.И., Юшина Е.А., Богуш В.И.**

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Россия  
125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом.11  
mgupr@mgupr.ru*

Наличие в пищевой смеси гидролизованного и нативного продукта при сохранении активного фермента позволяет получить смесь, подобную хумусу и имитировать естественный процесс гетерофазного пищеварения.

**Ключевые слова:** микромицет *Mortierella reticulata*, полиненасыщенные жирные кислоты, синерезис жиров, стабилизатор консистенции.

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) играют важную роль в биологических системах. ПНЖК подвергаются биотрансформации липоксигеназами или циклооксигеназами, что приводит к образованию многочисленных низкомолекулярных регуляторов процессов, протекающих в клетках, тканях и организме в целом. Одна из важнейших ПНЖК – арахидоновая кислота. В течение последних двадцати лет значительные успехи были достигнуты в области биотехнологического получения арахидоновой кислоты с помощью низших грибов.

Получение питательной смеси для внутрикишечного зондового питания предусматривает измельчение и смешивание жировых, белковых и углеводных компонентов, воды и минеральной добавки, нагрев, гомогенизацию смеси, введение панкреатина, разделение смеси на две части, одну из которых подвергают ферментализации, сушку, дробление, перемешивание и восстановление водой перед использованием. При перемешивании дополнительно вводится препарат, полученный путем последовательного экстрагирования биомассы микромицета *Mortierella reticulata* неполярным экстрагентом в надкритическом состоянии, водой, щелочью, водой, кислотой, водой, щелочью и водой с последующим объединением первого экс-

тракта с твердым осадком, в количестве 0,5% по массе.

Смесь готовят, например, из следующих измельченных компонентов, мас.ч.:

мясо куриное отварное -155; хлопья овсяные «Геркулес» - 10; сливки 10%-ные - 125; яичный порошок – 45; айвовое пюре – 70; масло «Кубанское» - 33; картофельные хлопья -12; поваренная соль- 1; вода питьевая – 550.

Продукт нагревают до 32оС, гомогенизируют и вводят 0,03 мас.ч. панкреатина, после чего делят смесь на две части, например равные, одну из которых сушат при 40оС и дробят, а другую подвергают ферментализу, например, до накопления 45% аминного азота, сушат при 65оС и дробят. Далее обе части смешивают при введении, например, 2 мас.ч. препарата, полученного путем последовательно экстрагирования биомассы микромицета *Mortierellareticulate* неполярным экстрагентом в надкритическом состоянии, водой, щелочью, водой, кислотой, водой, щелочью и водой с последующим объединением первого экстракта с твердым осадком, а затем фасуют.

Введение более 0,05% по массе препарата из биомассы микромицета *Mortierellareticulate* приводит к резкому увеличению вязкости и желированию восстановленной смеси, что делает ее неприемлемой для введения через зонд.

В процессе хранения смеси синерезис жиров не происходит. При использовании смеси ее восстанавливают кипяченой водой. Расслаивание восстановленной смеси не происходит благодаря наличию в препарате из биомассы микромицета *Mortierellareticulate* хитозана и высших полиненасыщенных жирных кислот, выполняющих роль стабилизатора консистенции. Это облегчает введение смеси через зонд.

Введение препарата из биомассы микромицета *Mortierellareticulate* позволяет обогатить состав смеси витаминами группы F и пищевыми волокнами, что повышает сбалансированность ее состава. Исключается синерезис жиров в процессе хранения и расслаивание восстановленной смеси.

#### Литература:

1. Тутельян В.А., Вялков А.И., Разумов А.Н. и др. *Научные основы здорового питания*: – М.: Издательский дом «Панорама», 2010.- 816с.
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. Ершин 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

## PREPARATIONS BASED ON BIOMASS OF MIKROMITCETY MORTIERELLARETICULATA AS A STABILIZER OF BLENDS FOR PROBE NUTRITION.

Demidova T.I., Yushina E.A., Bogush V.I.

Federal State Educational Institution of Higher Education "Moscow State University of Food Production", Moscow, Russia, 125080, Moscow, Volokolamskoe highway 11.  
mgupp@mgupp.ru

The presence of hydrolyzed and native product in the food mixture while preserving the active enzyme makes it possible to obtain a mixture similar to chyme and to imitate the natural process of heterophasic digestion.

**Key words:** micromycete *Mortierellareticulate*, polyunsaturated fatty acids, grease syneresis, consistency stabilizer.

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) play an important role in biological systems. PUFAs undergo biotransformation with lipoxygenases or cyclooxygenases, which leads to the formation of numerous low-molecular regulators of the processes taking place in cells, tissues and the organism as a whole. One of the most important PUFAs is arachidonic acid. Over the past twenty years, significant advances have been made in the field of biotechnological production of arachidonic acid with the help of lower fungi.

The preparation of a nutritional mixture for intraspective probe nutrition provides grinding and mixing of fat, protein and carbohydrate components, water and mineral additives, heating, homogenization of the mixture, administration of pancreatin, separation of the mixture into two parts, one of which is subjected to fermentolysis, drying, crushing, mixing and reduction water before use. With stirring, the preparation obtained by sequential

extraction of biomass of micromycete *Mortierella reticulata* by a non-polar extractant in a supercritical state, with water, alkali, water, acid, water, alkali and water, followed by combining the first extract with a solid precipitate, in an amount of 0.5% by weight, is additionally added.

The mixture is prepared, for example, from the following crushed components, parts by weight:

boiled chicken meat -155; flakes of oatmeal "Hercules" - 10; cream 10% -125; egg powder - 45; quince puree - 70; oil "Kubanskoye" - 33; potato flakes -12; table salt - 1; drinking water - 550.

The product is heated to 32 ° C, homogenized and 0.03 parts by weight of pancreatin is introduced, after which the mixture is divided into two parts, for example equal, one of which is dried at 40 ° C and crushed, and the other is subjected to fermentolysis, for example, to accumulation of 45% amine nitrogen, dried at 65 ° C and then crushed. Further, both parts are mixed with, for example, 2 parts by weight of preparation, obtained by sequentially extracting biomass *Mortierella reticulata* non-polar extractant in a supercritical state, water, alkali, water, acid, water, alkali and water and then combining the first extract with the solid precipitate, and then packaged.

The introduction of more than 0.05% by weight of the preparation from biomass micromycete *Mortierella reticulata* results in a sharp increase in viscosity and gelling of the reconstituted mixture, which makes it unacceptable for insertion through the probe.

During the storage of the mixture, the syneresis of fats does not occur. When using the mixture, it is reconstituted with boiled water. The separation of the reconstituted mixture does not take place due to the presence in the biomass preparation of micromycete *Mortierella reticulata* chitosan and higher polyunsaturated fatty acids, which serve as a consistency stabilizer. This facilitates the introduction of the mixture through the probe.

The introduction of the preparation from biomass micromycete *Mortierella reticulata* allows enriching the composition of the mixture with Group F vitamins and dietary fiber, which increases the balance of its composition. Excludes the syneresis of fats during storage and delamination of the reconstituted mixture.

#### References:

1. Tutelian VA, Vyalkov AI, Razumov A.N. and others. *Scientific foundations of healthy nutrition*: - M.: Publishing house "Panorama", 2010.- 816с.
2. Eroshin V.K., Dedyukina E.G. *Effect of lipids from *Mortierella* on plant resistance to phytopathogens // World J. of Mikrobiol. & Biotechnol. 2002.-Vol.18.-P.165-167*
3. Eroshin VK, Dedyukhina E.G. et al. *A study of the synthesis of arachidonic acid by fungi of the genus *Mortierella*: a microbiological method of selecting arachidonic acid producers // Microbiology.1996.- T.65, issue 1.-с. 31-36*

УДК 664.785.86

## ПРИМЕНЕНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА В-ГЛЮКАНА

**Гематдинова В. М., Канарская З.А., Канарский А.В.**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»), Казань, Россия, 420015, Казань, ул. Л. Толстого, д.8  
e-mail: venera.nas14@yandex.ru

Показана целесообразность ферментативной обработки вторичных ресурсов переработки овса с получением β-глюкана. В качестве ферментных препаратов рекомендуется использовать амилолитические и протеолитические ферментные препараты

**Ключевые слова:** отруби овса, гидробаротермическая, щелочная, ферментативная обработка, β-глюкан.

Современная диетология обращает внимание на необходимость потребления человеком нерастворимых и растворимых пищевых волокон и, в частности, β-глюкана. Это вещество обладает широким спектром биологической активности. Перспективным источником β-глюкана для пищевых целей являются зерновые культуры ячмень, пшеница и овес. Повышенный интерес к зерновым культурам связан с высоким содержанием растворимых разветвленных не крахмалистых полисахаридов, из которых возможно получение β-глюкана, который находится преимущественно в алейроновом слое зерновки. При переработке зерновых культур в муку и крупы β-глюкан концентрируется в отрубях. Поэтому сырьем для промышленного получения β-глюкана как пищевого продукта являются, в частности, отруби овса, из которых возможно получить изоляты β-глюкана.

Экстракционные способы получения  $\beta$ -глюкана из зерновых культур и отходов их переработки предусматривают использование растворов щелочей и кислот. Однако, эти вещества агрессивны, вызывают коррозию оборудования, опасны в производстве для человека, кроме того на стадиях выделения  $\beta$ -глюкана технологические среды необходимо нейтрализовать кислотами. В этой связи актуальна разработка биокаталитических способов получения  $\beta$ -глюкана.

Цель настоящей работы - определение влияния гидробаротермической, щелочной, и ферментативной обработок овсяных отрубей на выход  $\beta$ -глюкана.

Установлено, что сочетание предварительной гидробаротермической обработки и последующей обработкой амилазами и протеиназами овсяных отрубей является более эффективным, так как выход  $\beta$ -глюкана выше по сравнению с щелочным способом предварительной обработки сырья. Выход повышается с 9,6 до 12,9%

Способ предварительной обработки овсяных отрубей также влияет на содержание  $\beta$ -глюкана в конечном продукте после сушки. Предварительная гидробаротермическая обработка и последующая ферментативная обработка овсяных отрубей позволяет получить конечный продукт с более высоким содержанием  $\beta$ -глюкана по сравнению с предварительной щелочной обработкой. Содержание в продукте 87,9%, полученном сочетанием предварительной гидробаротермической обработки и ферментативной обработки овсяных отрубей, содержится меньшее количество сопутствующих веществ, в частности, простых сахаров, содержание которых 2,3%.

UDK 664.785.86

## APPLICATION OF BIOCATALYTIC METHODS IN THE TECHNOLOGY OF PRODUCTION OF B-GLUCANE

Gematdinova V.M., Kanarskaya Z.A., Kanarskiy A.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kazan National Research Technological University" ("KNRTU") Kazan, Russia,  
420015, Kazan, L. Tolstoy st. 8  
e-mail: venera.nas14@yandex.ru

The expediency of enzymatic processing of secondary resources of oats processing with obtaining  $\beta$ -glucan is shown. As enzyme preparations it is recommended to use amylolytic and proteolytic enzyme preparations

**Key words:** oat bran, hydrobarothermic, alkaline, enzymatic treatment,  $\beta$ -glucan.

Modern dietology draws attention to the need for human consumption of insoluble and soluble dietary fiber, and in particular,  $\beta$ -glucan. This substance has a wide spectrum of biological activity. A promising source of  $\beta$ -glucan for food purposes are grains of barley, wheat and oats. The increased interest in cereals is associated with a high content of soluble branched non-starchy polysaccharides, from which it is possible to obtain  $\beta$ -glucan, which is mainly in the aleurone layer of the grains. When processing cereals in flour and cereals,  $\beta$ -glucan is concentrated in the bran. Therefore, raw materials for the industrial production of  $\beta$ -glucan as a food product are, in particular, oat bran, from which  $\beta$ -glucan isolates can be obtained.

Extraction methods for the production of  $\beta$ -glucan from cereal crops and waste from their processing involve the use of solutions of alkalis and acids. However, these substances are aggressive, cause corrosion of equipment, are dangerous in human production, in addition, at the stages of  $\beta$ -glucan release, technological media must be neutralized with acids. In this connection, the development of biocatalytic methods for the production of  $\beta$ -glucan is important.

The purpose of this work is to determine the effect of hydrobarothermic, alkaline, and enzymatic treatments of oat bran on the yield of  $\beta$ -glucan.

It has been established that the combination of the preliminary hydrobarothermal treatment and the subsequent treatment with amylases and proteinases of oat bran is more effective, since the yield of  $\beta$ -glucan is higher compared to the alkaline pretreatment of raw materials. The yield rises from 9.6 to 12.9%

The method for pretreating oat bran also affects the content of  $\beta$ -glucan in the final product after drying. Preliminary hydrobarothermal treatment and subsequent enzymatic treatment of oat bran allows to obtain the final product with a higher content of  $\beta$ -glucan in comparison with the preliminary alkaline treatment. The 87.9% content in the product, obtained by combining the preliminary hydrobarothermic treatment and the enzymatic processing of oat bran, contains less concomitant substances, in particular, simple sugars, the content of which is 2.3%.



УДК 637.344.8

## ПРИМЕНЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА ГАЛАКТООЛИГОСАХАРИДОВ

Рябцева С. А., Храмцов А.Г., Лодыгин А.Д., Котова А. А., Скрипнюк А.А., Родная А.Б.  
ФГАОУ ВО Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия  
355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1  
ryabtseva07@mail.ru

Исследованы процессы получения галактоолигосахаридов-пребиотиков с использованием дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir* и молочнокислых микроорганизмов *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*.

**Ключевые слова:** галактоолигосахариды, синтез, дрожжи, молочнокислые бактерии

К перспективным направлениям применения лактозосбраживающих дрожжей относится получение галактоолигосахаридов (ГОС). ГОС являются неперевариваемыми углеводами, способными избирательно стимулировать рост и биологическую активность защитной микрофлоры кишечника человека. Пребиотические и технологические свойства ГОС (сладость, устойчивость к высоким температурам и низким значениям pH, криопротекторным свойствам) позволяют достаточно широко использовать их в производстве различных продуктов функционального питания [1].

На основе анализа литературы и патентов систематизирована информация о дрожжах 20 родов как продуцентах ГОС; показано, что в известных способах получения ГОС параметры проведения трансгликозилирования и выход ГОС существенно варьируют; сформулировано предположение о том, что для повышения выхода ГОС может быть использовано комбинирование культур дрожжей и молочнокислых бактерий [2].

Исследованы закономерности процессов получения ГОС в растворах молочного сахара и пермеата с использованием дрожжей (*Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*) и молочнокислых микроорганизмов (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*). Максимальная концентрация ГОС (50,9 % от общего содержания сахаров) была получена при использовании дрожжей *Kl. marxianus*, ферментации при температуре 520С в течение 24 часов в растворе пермеата молочной сыворотки с концентрацией лактозы 15 %. Установлено, что внесение *Str. thermophilus* после культивирования дрожжей *Kl. marxianus* SK перед началом процесса автолиза позволяет сократить как время автолиза (с 24 до 6 часов), так и время синтеза ГОС (с 24 до 8 часов) [3].

По результатам исследований разработан и запатентован способ получения пищевой добавки для функционального питания с повышенным содержанием ГОС и низкой себестоимостью [4].

Литература:

1. Tymczyszyn E. E. History, synthesis, properties, applications and regulatory issues of prebiotic oligosaccharides. Review / E. E. Tymczyszyn, M. I. Santos, M. C. Costa, A. Illanes, A. Gomez-Zavaglia, M. G. Ganzle // *Carbohydrates Applications in Medicine*. – 2014 – P. 127-154.
2. Храмцов А.Г. Применение дрожжей – продуцентов бета-галактозидаз для получения галактоолигосахаридов из лактозосодержащего сырья / Храмцов А.Г., Рябцева С.А., Панфилова А.А., Родная А.Б., Лодыгин А.Д. // *Хранение и переработка сельхозсырья*. – 2012. – №8. – с. 36 – 39
3. Котова А.А. Исследование процесса синтеза галактоолигосахаридов с использованием лактозосбраживающих дрожжей и молочнокислых микроорганизмов / Котова А.А., Рябцева С.А., Лодыгин А.Д., Скрипнюк А.А., Родная А.Б. // *Известия вузов. Пищевая технология*, № 5-6 (347-348). – 2015. – С.14-18.
4. Патент РФ № 2539741 / Приор. 03.10.2013, опублик. 27.01.2015.

UDC 637.344.8

## APPLICATION OF YEAST AND LACTIC ACID BACTERIA FOR GALACTOOLIGOSACCHARIDES BIOSYNTHESIS

Ryabtseva S.A., Khramtsov A.G., Lodygin A.D., Kotova A.A., Skripnyuk A.A., Rodnaya A.B.

FGAOU VO North-Caucasian Federal University, Stavropol, Russia  
355009, city of Stavropol, ul. Pushkin, 1  
ryabtseva07@mail.ru

The processes of galactooligosaccharide-prebiotics obtaining using yeast *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir* and lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* have been studied.

**Key words:** galactooligosaccharides, synthesis, yeast, lactic acid bacteria

The promising applications of lactose-fermenting yeast include the production of galactooligosaccharides (GOS). GOS are indigestible carbohydrates capable of selectively stimulating the growth and biological activity of the human intestine protective microflora. Prebiotic and technological properties of GOS (sweetness, resistance to high temperatures and low pH, cryoprotective properties) allow them to be widely used in the production of various functional food products [1].

Based on the analysis of literature and patents, information on the yeast of 20 genera as producers of GOS is systematized; it has been shown that in the known methods of GOS preparation, the parameters of carrying out the transglycosylation and the yield of GOS significantly vary; a hypothesis is made that a combination of yeast and lactic acid bacteria can be used to increase the yield of GOS [2].

The regularities of GOS processes production in solutions of milk sugar and permeate using yeast (*Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*) and lactic acid microorganisms (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*) were studied. The maximum concentration of GOS (50.9% of the total content of sugars) was obtained using yeast *Kl. marxianus*, fermentation at 52°C for 24 hours in a solution of whey permeate with a lactose concentration of 15%. It is established that the introduction of *Str. thermophilus* after cultivation of yeast *Kl. marxianus* SK before the start of the autolysis process allows to reduce both autolysis time (from 24 to 6 hours) and the time of synthesis of GOS (from 24 to 8 hours) [3].

Based on the results of the research, a method for production of a food supplement for functional nutrition with a high content of GOS and a low cost has been developed and patented [4].

### References:

1. Tymczysz E. E. History, synthesis, properties, applications and regulatory issues of prebiotic oligosaccharides. Review / E. E. Tymczyszyn, M. I. Santos, M. C. Costa, A. Illanes, A. Gomez-Zavaglia, M. G. Ganzle // *Carbohydrates Applications in Medicine*. - 2014 - P. 127-154.
2. Khramtsov A. G. Application of yeast - producers of beta-galactosidases for the preparation of galactooligosaccharides from lactose-containing raw materials / Khramtsov AG, Ryabtseva SA, Panfilova AA, Rodnaya AB, Lodygin AD // *Storage and processing of agricultural raw materials*. - 2012. - №8. - from. 36 - 39
3. Kotova A.A. Investigation of the synthesis of galacto-oligosaccharides using lactose-fermenting yeasts and lactic acid microorganisms / Kotova AA, Ryabtseva SA, Lodygin AD, Skripnyuk AA, Rodnaya AB // *News of Universities. Food technology*, No. 5-6 (347-348). - 2015. - P.14-18.
4. Patent of the Russian Federation No. 2539741 / Prior. 10/03/2013, publ. 01/27/2015.

УДК 613.2.03

## ПРОДУКТЫ ПИТАНИЯ ДЛЯ ЗДОРОВЬЯ

В.И.Белявская <sup>1</sup>, Э.К.Мухамеджанов <sup>2</sup>

<sup>1</sup> КазНМУ им. С.Д.Асфендиярова, Казахстан, 050057, Алматы, Джандарбекова, 180, v.belyavskaya@mail.ru, +7 777 9 700 800

<sup>2</sup> КазНМУ им. С.Д.Асфендиярова, Казахстан, 050000, Алматы, ул.Гоголя, 96/98,

Обсуждается необходимость включения в специализированные продукты для сохранения работоспособности и здоровья человека сульфатированного полисахарида морских водорослей фукоидана. Это придаст продукту возможность защищать организм от неблагоприятного влияния биологических (бактерии), химических (токсические соединения) и физических (излучения) факторов внешней среды.

**Ключевые слова:** фукоидан; профилактика; здоровье, продукты питания

На человека действуют неблагоприятные факторы окружающей среды (ОС) химической, физической и биологической этиологии, повышенные психические нагрузки, что оказывает отрицательное влияние на его здоровье. В этом плане питание может выступать защитным фактором против негативных факторов ОС. Особое внимание в этом плане отводят нутрицевтикам (производное от слов нутриология или питания и фармацевтика). Морские растительные продукты прошли многомиллионную адаптацию к негативным факторам ОС и выработали биоактивные соединения для защиты от них. Среди них особый интерес привлекает сульфатированный полисахарид бурых морских водорослей фукоидан.

От других полисахаридов он отличается тем, что 80% моносахаридов приходится на Л-фукозу и содержится много сульфатных группировок, чем и обуславливается его биоактивность. Пища нам предоставляет структурные (аминокислоты), энергетические (углеводы и жиры) и регуляторные (витамины и микроэлементы) соединения. В этом плане фукоидан выступает как «умная пища», которая регулирует включение этих соединений в обменные процессы. Так фукоидан снижает гликемический коэффициент крахмал содержащих продуктов и улучшает утилизацию глюкозы тканями, оказывая положительное влияние в профилактике и лечении диабета и ожирения [1]. Улучшает процессы остеосинтеза, что препятствует развитию остеопороза, а за счет препятствования развитию воспалительных процессов оказывает выздоравливающее влияние при остеоартритах [2].

Фукоидан – это высокомолекулярный полисахарид, биологическое влияние которого в значительной степени зависит от его молекулярного веса и степени сульфатирования. Высокомолекулярный фукоидан оказывает свои биологические эффекты за счет воздействия на работу желудочно-кишечного тракта. Низкомолекулярный фукоидан лучше подвергается пиноцитозу и более эффективен в регуляции деятельности органов и тканей. Используя биотехнологические технологии можно расширить сферы применения фукоидана в сохранении здоровья и работоспособности человека [3].

Таким образом, помимо принципов разработки функционального питания или облегченного для усвоения, необходимо развивать другую сферу питания, когда питание будет влиять на поддержание гомеостатических показателей и во многом улучшать работу нейро-гормонального звена регуляции.

Таким образом, помимо принципов разработки функционального питания или облегченного для усвоения, необходимо развивать другую сферу питания, когда питание будет влиять на поддержание гомеостатических показателей и во многом улучшать работу нейро-гормонального звена регуляции.

#### Литература:

Список литературы 1. Shan X. et al., *In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans*. *Int.J.Biol. Macromol.*-2016.-V.82.-P.249-55 2. S.P.Myers et al., *A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis* *Biologics*.-2010.-V.4.-P.33–44 3. Silva V.A.J. et al., *Synthesis and characterization of Fe3O4 nanoparticles coated with fucan polysaccharides*. *J. Magn. Magn. Mater.*-2013.-V.343.-P.138–14

UDC 613.2.03

## FOOD PRODUCTS FOR HEALTH

V.Belyavskaya <sup>1</sup>, E.Mukhamejanov <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarova,, Kazakhstan, 050057, Almaty, Dzandarbekov streer, 180

<sup>2</sup> Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarova,, Kazakhstan, 050000, Almaty, Gogol Str., 96/98

Discussed the need to include a fucoidan, a sulfated polysaccharide of seaweed, in specialized products to preserve human health and working capacity. This will allow the product to protect the body from the adverse effects of biological (bacteria), chemical (toxic compounds) and physical (radiation) environmental factors.

**Key words:** fucoidan; prophylaxis; health, food products

Human beings are exposed to unfavorable environmental factors (EF) of chemical, physical and biological etiology, increased mental stress, which has a negative impact on their health. In this regard, nutrition can serve as a protective factor against negative EF. Particular attention at that point is given to nutraceuticals (derived from the words nutriology

or nutrition and pharmaceuticals). Marine plant products have been undergone a multimillion adaptation to negative EF and have developed bioactive compounds to protect against them. Among them, the sulfated polysaccharide of brown seaweed a fucoidan is of particular interest.

It differs from other polysaccharides because its 80% of monosaccharides are L-fucose ones and there are many sulfate groups, which determines its bioactivity. Food supplies us with structural (amino acids), energy (carbohydrates and fats) and regulatory (vitamins and trace elements) compounds. In this regard, fucoidan appears as a "smart food", which regulates the inclusion of these compounds in metabolic processes. So fucoidan reduces the glycemic index of starch containing foods and improves the utilization of glucose by tissues, having a positive effect in the prevention and treatment of diabetes and obesity. It improves the processes of osteosynthesis, which prevents the development of osteoporosis, and at due to obstructing the development of inflammatory processes has a convalescing effect in osteoarthritis.

Fucoidan is a high molecular polysaccharide whose biological effect depends to a large extent on its molecular weight and the degree of sulfation. High molecular fucoidan has its biological effects on the work of the gastrointestinal tract. Low molecular fucoidan is better subjected to pinocytosis and is more effective in regulating the activity of organs and tissues. Using biotechnology technologies, it is possible to expand the scope of application of fucoidan in preserving the health and working capacity of a person.

Thus, in addition to the development of principles of functional nutrition and facilitated nutrition assimilation, it is necessary to develop another area of nutrition, when nutrition will affect the maintenance of homeostatic parameters and in many ways improve the work of the neuro-hormonal regulation unit.

Thus, in addition to the development of principles of functional nutrition and facilitated nutrition assimilation, it is necessary to develop another area of nutrition, when nutrition will affect the maintenance of homeostatic parameters and in many ways improve the work of the neuro-hormonal regulation unit.

#### References:

1. Shan X. et al., *In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans*. *Int. J. Biol. Macromol.*-2016.-V.82.-P.249-55
2. S.P.Myers et al., *A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis* *Biologics*.-2010.-V.4.-P.33-44
3. Silva V.A.J. et al., *Synthesis and characterization of Fe3O4 nanoparticles coated with fucan polysaccharides*. *J. Magn. Magn. Mater.*-2013.-V.343.-P.138-143

УДК: 615.01

## РАДИОПРОТЕКТОРНЫЕ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ГЕЛЯ ИЗ БУРЫХ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ

Одинец А.Г.

ФГБУН ГНЦ РФ «Институт медико-биологических проблем» РАН,  
Москва, Россия  
123007, Москва, Хорошевское шоссе, дом 76-А,  
e-mail: livehelp@mail.ru

Изучены радиопротекторное и антиоксидантное действие фармакологически активных соединений, входящих в состав бурых морских водорослей.

**Ключевые слова:** бурые морские водоросли, радиопротекторное действие, антиоксидантное действие, альгиновая кислота, альгинаты, фукоидан, *Laminaria japonica*

В последние годы появилось большое число исследований, посвященных сульфатированному полисахариду – фукоидану, подтверждающие его противовоспалительное, антиоксидантное, противовирусное, антикоагулянтное и противоопухолевое действие. Исследованы структура и механизмы действия альгиновой кислоты и альгинатов: способность связывать и выводить из организма радионуклиды, при высоких ионообменных и сорбционных свойствах; восстанавливать функциональную активность макрофагов, обеспечивая противомикробный и противогрибковый эффект; оказывать регенеративное, цитопротективное и иммуномодулирующее действие; способствовать нормализации кишечной перистальтики. Подробно описан процесс получения из бурых морских водорослей альгинат-содержащих средств для диетического питания, основанный на технологии T.C. Stanford.

Создан усовершенствованный способ получения гомогенизированного геля с размером частиц не более 500 мкм. Исследована радиационная стабильность геля из бурых морских водорослей с целью дальнейшего пищевого применения для защиты организма человека от неблагоприятных факторов

окружающей среды. С помощью метода радиационно-химического моделирования реакций изучен радиолиз водорослевых экстрактов. Определение динамики спектров оптического поглощения аэрированных экстрактов в ацетоне в зависимости от дозы выявило их устойчивость к излучению до дозы 1 кГр. Проведен расчет степени превращения геля в зависимости от изменения значений оптических плотностей при длинах волн 410 нм и 672.6 нм при воздействии ионизирующего излучения. Дезагрегация частиц геля под действием ионизирующего излучения дозой 30 кГр не выявлена. Проведено спектрофотометрическое исследование радиационно-химических превращений экстрактов в различных растворителях. Получены данные о высокой акцепторной способности по отношению к активным промежуточным продуктам радиолиза соединений, входящих в состав бурых морских водорослей. Доказана высокая радиопротекторная активность водорослевых экстрактов.

*Литература:*

1. Мирошников С.А., Нотова С.В., Мирошников С.В., Болодурина И.П., Скальный А.В. Региональные особенности элементного гомеостаза и проблема экологофизиологической адаптации: методологический аспект. Вестник восстановительной медицины; 2013; №6(58): 52-55.
2. Anisimova NY, Ustyuzhanina NE, Donenko FV, Bilan MI, Ushakova NA, Usov AI, Nifantiev NE, Kiselevskiy MV. Influence of Fucoidans and Their Derivatives on Antitumor and Phagocytic Activity of Human Blood Leucocytes. *Biochemistry (Moscow)*; 2015; 80(7): 925-933. doi: 10.1134/S0006297915070111.
3. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Кузнецова Т.А., Крыжановский С.П., Ковалев Н.Н., Звягинцева Т.Н. Гепатопротекторные эффекты экстрактов и полисахаридов морских водорослей. Антибиотики и химиотерапия; 2014; Т.59; № 3-4: 30-37.
4. Li XJ, Ye QF, *Can J. Physiol Pharmacol.* 2015 Nov; 93(11):999-1005. doi: 10.1139/cjpp-2015-0120. Epub 2015 Jun 1. Fucoidan reduces inflammatory response in a rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury. PMID:26485583
5. Li X, Zhao H, Wang O, Liang H, Jiang X. Fucoidan protects ARPE-19 cells from oxidative stress via normalization of reactive oxygen species generation through the Ca<sup>2+</sup> - dependent ERK signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*; 2015;11(5):3746-52. doi: 10.3892/mmr.2015.3224.
6. Marudhupandi T, Kumar TT, Senthil SL, Devi KN. In vitro antioxidant properties of fucoidan fractions from *Sargassum tenerrimum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*; 2014; 17(3):402-407.
7. Kuznetsova TA, Besednova NN, Mamaev AN, Momot AP, Shevchenko NM, Zvyagintseva TN. Anticoagulant activity of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk Sea. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*; 2003; 136(5):471-473.
8. Yamada M, Honma I. Alginic acid-imidazole composite material as anhydrous proton conducting membrane. *Polymer*; 2004; Vol. 45 (25): 8349–8354.
9. Барашков Г.К. Сравнительная биохимия водорослей. М.: Пищевая промышленность; 1972: 355.
10. Успенский Ю.П., Барышникова Н.В., Пахомова И.Г. Клинические перспективы использования препаратов на основе альгиновой кислоты в лечении гастроэзофагеальной рефлюксной болезни. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*; 2009; Т.19; № 2: 79-84.
11. Тишин В.Е. Технология производства и использования агара, фуцеллерана и альгината натрия за рубежом. ЦНИИТЭИРХ. Обзорная информация. Технология обработки рыбы и морепродуктов. М.; 1971, сер. 3; вып.4.:22-23.
12. Разумов А.Н., Вялков А.И., Козлов В.К., Бобровницкий И.П., Михайлов В.И., Подкорытова А.В., Одинец А.Г., Супрун С.В., Тулупов А.М. Морские водоросли в восстановительной медицине, комплексной терапии заболеваний с нарушением метаболизма. Москва: «МДВ»; 2008: 99.
13. Одинец А.Г. Патент РФ №2317092 «Способ оздоровления организма».
14. Одинец А.Г. Патент РФ №2006113960 «Способ производства геля из бурых водорослей для диетического и лечебно-профилактического питания».
15. Бах А.Н. О роли перекисей в процессах медленного окисления. *Журнал Русского Физико-химического Общества*; 1897; Т.29; № 6.:373.
16. Engler C., Wild W. *Über die Sogenannte "Activirung" des Sauerstoffs und über Superoxydbildung.* Ber. 1897; Jr.30; Bd. 2: 1669-1681.
17. Семенов Н.Н. Цепные реакции. М.: Госхимиздат; 1934: 555.
18. Эмануэль Н.М. Современные представления о механизме окисления в жидкой фазе и роли в нем перекисных радикалов. *Успехи химии органических перекисных соединений и аутоокисление.* М.: Химия; 1969: 319.
19. Зимица Г.М., Бах Н.А. Идентификация короткоживущих продуктов импульсного радиолиза углеводов, насыщенных кислородом. *Химия высоких энергий*; 1974; Т.8; № 1: 56-60.
20. Ладыгин Б.Я., Сараева В.В., Ревина А.А., Зимица Г.М. Вклад радиационно-химических исследований в общую теорию жидкофазного окисления. *Российский химический журнал*; 1997; Т.40; № 6: 78.
21. Ревина А.А. Радиационно-химическое моделирование быстропротекающих процессов с участием промежуточных кислородсодержащих реакционных центров в различных системах. Автореферат дисс. д.х.н.; 1995: 57.
22. Плюссин В.Ф. Радиационная химия. Новосибирск: НГУ; 2010: 195.

23. Антропова И.Г., Фенин А.А., Ревина А.А. Радиационно-химические превращения кумаринов в органических растворителях. *Химия высоких энергий*; 2007; Т.41; № 2: 90-94.

24. Ефимов А.А. Обоснование технологии получения хлорофилла из синезелёных водорослей как пищевой добавки. *Фундаментальные исследования*; 2007; №11: 45.

25. Pascal A.A., Caron L., Rousseau B., Lapouge K., Duval J.C., Robert B.. *Resonance Raman Spectroscopy of a Light -Harvesting Protein from the Brown Alga Laminaria Saccharina. Biochemistry*; 1998; Vol. 37: 2450-2457.

UBC: 615.01

## RADIOPROTECTIVE AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE GEL FROM BROWN ALGAE

**Odiniec A.G**

FGBUN GNC RF «Institut mediko-biologicheskikh problem» RAN, g.

Moskva, Russia

123007, Horoshevskoe shosse, dom 76-A

e-mail: livehelp@mail.ru

The aim of the work was to study the radioprotective and antioxidant action of pharmacologically active compounds belonging to the brown algae.

**Key words:** Brown seaweed, radioprotective effect, antioxidant effect, alginic acid, alginates, fucoidan, *Laminaria japonica*

In recent years, a large number of studies have been devoted to the sulfated polysaccharide - fucoidan, confirming its anti-inflammatory, antioxidant, antiviral, anticoagulant and anti-tumor effect. The paper describes the structure and mechanisms of action of alginic acid and alginates: the ability to bind and remove radionuclides from the body, at high ion exchange and sorption properties; restore the functional activity of macrophages, providing antimicrobial and antifungal effect; provide regenerative, cytoprotective and immunomodulatory effects; contribute to the normalization of intestinal motility. The process of obtaining from marine brown algae an alginate-containing dietary means, based on the TC Stanford technology, has been described in detail.

The advanced method for producing a homogenized gel with particle size less than 500 microns was presented. We investigated the radiation stability of the gel from brown algae for further use in food to protect the human body from adverse environmental factors. The radiolysis of algal extracts was investigated by the method of radiation-chemical modeling of reactions. The dynamics of optical absorption ranges of the aerated extracts in acetone was determined based on the dose and its resistance to radiation dose to 1 kGy was revealed. The calculation of the conversion degree of the gel was carried out according to the changes in the values of the optical density at a wavelength of 410 nm and 672.6 nm when exposed to ionizing radiation. Disaggregation of gel particles under the influence of ionizing radiation dose of 30 kGy is not revealed. Spectrophotometric study of radiation-induced chemical reactions of algae extracts in various solvents was conducted. We have obtained data on the high acceptor ability of the compounds belonging to the brown algae to an active intermediate radiolysis products. It has proved highly radioprotective activity of algal extracts.

### References:

1. Miroshnikov S.A., Notova S.V., Miroshnikov S.V., Bolodurina I.P., Skal'nyj A.V. [Regional features of element homeostasis and ecological problem of physiological adaptation: methodological aspect]. *Vestnik vosstanovitel'noj mediciny*; 2013; №6 (58): 52–55.
2. Anisimova NY, Ustyuzhanina NE, Donenko FV, Bilan MI, Ushakova NA, Usov AI, Nifantiev NE, Kiselevskiy MV. Influence of Fucoidans and Their Derivatives on Antitumor and Phagocytic Activity of Human Blood Leucocytes. *Biochemistry (Moscow)*; 2015; 80(7): 925-933. doi: 10.1134/S0006297915070111.
3. Besednova N.N., Zaporozhec T.S., Kuznecova T.A., Kryzhanovskij S.P., Kovalev N.N., Zvjaginceva T.N. [Hepatoprotective effect of extracts and polysaccharides of marine algae]. *Antibiotiki i himioterapija*; 2014; T.59; № 3-4: 30-37.
4. Li XJ, Ye QF, Can J. *Physiol Pharmacol*. 2015 Nov; 93(11):999-1005. doi: 10.1139/cjpp-2015-0120. Epub 2015 Jun 1. Fucoidan reduces inflammatory response in a rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury. PMID:26485583
5. Li X, Zhao H, Wang O, Liang H, Jiang X. Fucoidan protects ARPE-19 cells from oxidative stress via normalization of reactive oxygen species generation through the Ca<sup>2+</sup>-dependent ERK signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*; 2015; 11(5):3746-52. doi: 10.3892/mmr.2015.3224.
6. Marudhupandi T, Kumar TT, Senthil SL, Devi KN. *In vitro* antioxidant properties of fucoidan fractions from *Sargassum tenerrimum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*; 2014; 17(3):402-407.
7. Kuznetsova TA, Besednova NN, Mamaev AN, Momot AP, Shevchenko NM, Zvyagintseva TN. Anticoagulant activity

- of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* of the Okhotsk Sea. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*; 2003; 136(5):471-473.
8. Yamada M, Honma I. Alginate-imidazole composite material as anhydrous proton conducting membrane. *Polymer*; 2004; Vol. 45 (25): 8349–8354.
9. Barashkov G.K. [Comparative biochemistry of algae]. М.: Pishhevaya promyshlennost'; 1972: 355.
10. Uspenskij Ju.P., Baryshnikova N.V., Pahomova I.G. [Clinical perspectives of drugs based on alginic acid, for the treatment of gastroesophageal reflux disease]. *Rossiiskij zhurnal gastrojenterologii, gepatologii, koloproktologii*; 2009; T.19; № 2: 79-84.
11. Tishin V.E. [Foreign production technology and the use of agar, furcelleran and sodium alginate]. *CNIITJeRH. Obzornaja informacija. Tehnologija obrabotki ryby i moreproduktov. M.*; 1971, ser. 3; vyp.4: 22-23.
12. Razumov A.N., Vjalkov A.I., Kozlov V.K., Bobrovnickij I.P., Mihajlov V.I., Podkorytova A.V., Odinec A.G., Suprun S.V., Tulupov A.M. [Seaweed for regenerative medicine and the treatment of diseases with metabolic disorder]. *Moskva: «MDV»*; 2008: 99.
13. Odinec A.G. Patent RF №2317092 «Sposob ozdorovlenija organizma».
14. Odinec A.G. Patent RF №2006113960 «Sposob proizvodstva gelya iz buryh vodoroslej dlja dieticheskogo i lechebno-profilakticheskogo pitaniya».
15. Bah A.N. [The role of the peroxides during the slow oxidation]. *Zhurnal Russkogo Fiziko-himicheskogo Obshhestva*; 1897; T.29; № 6:373.
16. Engler C., Wild W. *Über die Sogenannte "Activirung" des Sauerstoffs und über Superoxyd bildung. Ber.* 1897; Jr.30; Bd. 2: 1669-1681.
17. Semenov N.N. [Chain reaction]. М.: Goshimizdat; 1934: 555.
18. Jemanujel' N.M. [Modern views on the mechanism of oxidation in the liquid phase and the role of peroxide radicals in the process]. *Uspehi himii organicheskikh perekisnyh soedinenij i autookislenie. M.: Himija*; 1969: 319.
19. Zimina G.M., Bah N.A. [Identification of short-pulse radiolysis products of saturated hydrocarbons with oxygen]. *Himija vysokih jenergij*; 1974; T.8; № 1: 56-60.
20. Ladygin B.Ja., Saraeva V.V., Revina A.A., Zimina G.M. [The contribution of radiation-chemical studies of the general theory of liquid-phase oxidation]. *Rossiiskij himicheskij zhurnal*; 1997; T.40; № 6: 78.
21. Revina A.A. [Radiation-chemical modeling of fast processes with oxygen-containing intermediates of the reaction centers in different systems]. *Avtoreferat diss. d.h.n.*; 1995: 57.
22. Pljusnin V.F. [Radiation chemistry]. *Novosibirsk: NGU*; 2010: 195.
23. Antropova I.G., Fenin A.A., Revina A.A. [Radiation chemical transformations of coumarin in organic solvents]. *Himija vysokih jenergij*; 2007; T.41; № 2: 90-94.
24. Efimov A.A. [Justification of obtaining technology of chlorophyll from blue green algae as a food additive]. *Fundamental'nye issledovanija*; 2007; №11: 45.
25. Pascal A.A., Caron L., Rousseau B., Lapouge K., Duval J.C., Robert B. Resonance Raman Spectroscopy of a Light-Harvesting Protein from the Brown Alga *Laminaria Saccharina*. *Biochemistry*; 1998; Vol. 37: 2450-2457.

УДК: 636.39: 637.146.3

## РАЗРАБОТКА ЙОГУРТОВ, ОБОГАЩЕННЫХ ПИЩЕВЫМИ ВОЛОКНАМИ

**Т.В.Тимофеева, Ю.В.Ушакова, Г.Е.Рысмухамбетова, М.В.Белова**

ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, Россия, 410012, Саратов, Театральная пл., 1, [veranika.timofeeva@yandex.ru](mailto:veranika.timofeeva@yandex.ru), (8452) 23-47-81

Разработана расширенная линейка йогуртов с добавлением разных пищевых волокон, для получения конкурентоспособного функционального продукта, подобраны оптимальные концентрации вводимых пищевых волокон, отработаны технологии приготовления йогуртов и проведены органолептические, физико-химические и микробиологические исследования изучаемых образцов.

**Ключевые слова:** йогурт, функциональное питание, ксантан (Xanthan gum), арабик (Gum Arabic), трагакант (Gum Tragacanth), пищевые волокна бамбука, камеди.

В настоящее время перед индустрией питания стоят задачи производства продуктов функционального, лечебного и лечебно-профилактического назначения, обладающих как широким спектром применения, так и точечной направленностью на конкретный орган, систему, заболевание [1].

Целью данной работы является создание расширенной линейки йогуртов, с добавлением разных пищевых волокон, в том числе и полисахаридов (ПС), для получения продукта с высокими показателями качества.

Нами были взяты четыре компонента, среди которых три ПС: ксантан (Xanthan gum), арабик (Gum Arabic), трагакант (Gum Tragacanth) и пищевые волокна бамбука (концентрат). В качестве контрольного образца была взята технология йогурта на коровьем молоке и сухой закваски «Эвиталия» [2]. В ходе проведенной работы

в опытные образцы были добавлены полисахариды с разными концентрациями: 0,3; 0,7; 1 г соответственно. Волокна бамбука добавлялись в концентрациях 5; 7; 10 г соответственно. В ходе проведенных исследований замечено, что наилучшими органолептическими показателями отличились образцы с добавлением ПС арабика в концентрации 0,3 г на 100 г продукта и пищевых волокон бамбука в количестве 5 г /100 г. Введение арабика в количестве 0,7 г и 1 г изменяет вкус готового продукта, снижая приятную и характерную кислотность [3]. Добавление пищевых волокон бамбука в выбранных концентрациях показало положительный результат, но появился слегка мучной привкус.

Кроме того, нами были изучены физико-химические показатели представленных образцов, которые сравнивались с данными контроля. Кислотность опытных образцов с добавлением арабика и волокон бамбука была превышена в среднем на 18 % по сравнению со значениями контрольного образца. Массовая доля сухих веществ полученных образцов с арабиком и волокнами бамбука в среднем меньше на 10 %, чем у контроля. Кислотность опытных образцов с добавлением ксантана и трагаканта в среднем на 20 % меньше данных контрольного образца. Массовая доля сахара у всех полученных образцов приближена к данным контрольного образца и равна примерно 2 % [4,5].

Таким образом, нами были составлены рецептуры и отработаны технологии приготовления йогуртов с добавлением пищевых волокон, а также данную разработанную продукцию рекомендуем применять в функциональном питании.

#### Литература:

Список литературы: 1. Функциональные напитки и напитки специального назначения / Пакен П. – СПб: Профессия, 2010. – 496 с. 2. Инструкция по приготовлению целебного кисломолочного продукта из сухой закваски "Эвиталя". - Режим доступа: <http://evitalia.ru/all-family-pill1> 3. ГОСТ 31981-2013. Йогурты. Общие технические условия 4. ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности 5. Методическое пособие по дисциплине «Стандартизация и контроль качества продукции общественного питания» для студентов 5 курса очного и 6 курса заочного формы обучения специальности 260501 «Технология продукции общественного питания» / Г.Е. Рысмукхамбетова – Саратов: ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ», 2012. - 107с.

UDC 636.39: 637.146.3

## DEVELOPMENT OF YOGHURTS ENRICHED WITH FOOD FIBERS

V.Timofeeva, Y.Ushakova, G. Rysmukhambetova, M.Belova

Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Russian Federation, 410012, Saratov, Teatralnaya, 1

An extended line of yoghurts with various dietary fibers added was developed to obtain a competitive functional product, optimal concentrations of the dietary fibers introduced were selected, technologies for yogurt preparation were designed; organoleptic, physicochemical and microbiological studies of our samples were conducted.

**Key words:** yoghurt, functional nutrition, xanthan gum, gum arabic, gum tragacanth, bamboo dietary fiber, gum.

Currently, the food industry faces the problem of producing food of functional, therapeutic and therapeutic-prophylactic use, which would have both a wide range of applications and a point-directed focus on a particular organ, system or disease [1].

The aim of this work was to design an extended line of yoghurts, with the addition of various dietary fibers, including polysaccharides (PS), to obtain a high-quality product.

We took four components, of which there were three PS, namely: xanthan gum, gum arabic, gum tragacanth, and bamboo fiber (concentrate). As a reference sample, the yogurt technology on cow's milk and dry Evitalia™ yeast was used [2]. In the course of our work, these polysaccharides were added to test samples: 0.3 g, 0.7 g, and 1 g, respectively. Bamboo fibers were added with amounts of 5 g, 7 g, and 10 g, respectively. The samples with gum arabic in an amount of 0.3 g/100 g of product and bamboo dietary fiber in an amount of 5 g/100 g had the best organoleptic indices. The introduction of gum arabic in amounts of 0.7 g and 1 g modified the taste of the finished product, reducing its pleasant and characteristic acidity [3]. Adding bamboo fiber at the selected concentrations showed a positive result, but a slightly floury taste appeared.

In addition, we studied physicochemical parameters of the samples, which were compared with the reference data. The acidity of our test samples with the addition of gum arabic and bamboo fibers exceeded that of the reference sample by 18% on average. The mass fraction of dry substances of our samples with gum arabic and bamboo fibers was, on average, 10% less than that of the reference. The acidity of the test samples with xanthan gum and gum tragacanth added was 20% less than that of the reference sample (on average). The mass fraction of sugar in all the samples obtained was close to that in the reference sample (approx. 2%) [4, 5].



Thus, we have designed recipes and developed a technology for preparing yoghurts with dietary fiber added, and this novel product is recommended for use in functional nutrition.

*References:*

*Bibliography: 1. Functional and Speciality Beverage Technology / Ed. P. Paquin. - Woodhead Publishing, 2009. - 512 p. 2. Instruction for the preparation of a medicinal fermented milk product from dry Evitalia™ yeast. - Access mode: <http://evitalia.ru/all-family-pill1> [Russ] 3. GOST 31981-2013. Yoghurts. General specifications [Russ] 4. GOST 3624-92. Milk and dairy products. Titrimetric methods for acidity evaluation [Russ] 5. G.E. Rysmukhambetova. Methodological manual on the discipline "Standardization and quality control of catering products" for 5-year full-time students and 6-year students of correspondence course, specialty 260501 "Technology of public catering products" – Saratov, Saratov State Agrarian Inspection, 2012. – 107 p. [Russ]*

УДК: 663.15, ББК: 28.4

## РАЗРАБОТКА ПРОДУЦЕНТА МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ДЛЯ СЫРОДЕЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ НА ОСНОВЕ ПРОХИМОЗИНА VICUGNA RASOS

**С.В.Беленькая, В.В.Ельчанинов, А.П.Рудометов, Д.Н.Щербаков**

*Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, Новосибирск, Пирогова, 2, belenkaya.sveta@gmail.com, 89137054380*

Впервые получен рекомбинантный аналог прохимозина *Vicugna ramos*, специфическая активность которого выше чем у контрольного фермента, полученного с помощью генетической последовательности прохимозина *Bos taurus*.

**Ключевые слова:** сычужный фермент, рекомбинантный химозин, прохимозин альпаки, молокосвертывающая активность

Традиционный способ получения молочного сгустка при производстве сыра, основан на использовании сычужного фермента, выделяемого из желудков молочных телят. Но в связи с быстрыми темпами роста производства сыров, с конца 80х годов прошлого века начались работы по получению коагулянтов молока методами генной инженерии. В настоящее время продолжают работы по поиску новых молокосвертывающих ферментов. В результате нашей работы был разработан продуцент, обеспечивающий наработку рекомбинантного химозина *Vicugna ramos*. Для полученного препарата определены основные технологические показатели.

Химозин - это пищеварительный фермент, принадлежащий к семейству аспарагиновых протеиназ. Он синтезируется в слизистой оболочке желудка млекопитающих и переходит в активную форму в кислой среде желудочного сока [1]. Молоко - сложная биологическая жидкость, в состав которой входят белки, жиры, лактоза, лимонная кислота, и неорганические компоненты. Большая часть белков в молоке - это каппа-казеин [2]. Под действием химозина происходит протеолитическое расщепление связи между фенилаланином и метионином этого белка и и его переход в нерастворимый пара-каппа-казеин и растворимый казеин. В присутствии Ca<sup>2+</sup>, кальций чувствительный каппа-казеин вместе с нерастворимым пара-каппа-казеином формирует молочный сгусток. В настоящее время основным коагулянтм молока при промышленном производстве сыра является бычий рекомбинантный химозин, обладающий эталонной молокосвертывающей активностью. Однако недавно был разработан новый молокосвертывающий фермент, демонстрирующий улучшенные технологические характеристики. Установлено, что расход рекомбинантного химозина верблюда (*Camelus dromedarius*), по сравнению с рекомбинантным химозином коровы, на 70-80% ниже [3]. Таким образом, задача получения новых рекомбинантных химозинов с улучшенными биохимическими и технологическими показателями, является по прежнему актуальной. Причем, речь идет не столько о модификации рекомбинантного химозина коровы, но и о поиске новых вариантов химозинов других видов млекопитающих.

В ходе проведения биоинформатических работ, с целью поиска кандидатных химозинов с улучшенными биохимическими свойствами, были проанализированы последовательности прохимозинов представленных в GenBank. В результате был отобран ген химозина *Vicugna ramos*, и на его основе спроектирована экспрессионная кассета, оптимизированная для системы *E. coli*. Сконструирована серия векторов, содержащих разработанную экспрессионную кассету, а также кассету, содержащую ген химозина *Bos taurus* (в нашей работе выступавшего в качестве контроля). Разработаны продуценты рекомбинантных прохимозинов *Vicugna ramos* и *Bos taurus* на основе штамма BL21(DE3) *E. coli*. После оптимизации условий наработки ферментов, полученные

препараты рекомбинантных химозинов были охарактеризованы по основным технологическим и физико-химическим параметрам (термостабильность, чувствительность к кальцию, молокосвертывающая и общая протеолитическая активность).

*Литература:*

1) Takahashi K. Gene structures of pepsinogens A and C//Scand J. Clin. Lab. Invest. 1992. № 52. P. 97–110. 2) Fox P. F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening//Biotechnol Appl Biochem. 1988. № 10. P. 522–535. 3) Kappeler S. R., van den Brink H. J., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E. B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk//Biochem Biophys Res Commun. 2006. № 342. P. 647–654.

**Финансирование:** Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Программа "Умник" № 12050ГУ/2017

UDC 663.15, BBC 28.4

## DEVELOPMENT OF THE MILK COAGULATING FERMENT PRODUCER FOR THE CHEESE-MAKING INDUSTRY BASED ON PROCHIMOSIN VICUGNA PACOS.

S.Belenkaya, V.Elchaninov, A.Rudometov, D.Shcherbakov

Novosibirsk state university, Russia, 630090, Novosibirsk, Plogova, 2

For the first time, a recombinant analog of prochymosin Vicugna pacos is obtained, whose specific activity is higher than in the control enzyme obtained with the genetic sequence of prochymosin Bos taurus.

**Key words:** rennet, recombinant chymosin, prochymosin of alpaca, milk-coagulating activity

The traditional way of obtaining a milk clot in the cheese production is based on using of rennet enzyme, isolated from the stomachs of dairy calves. But in connection with the rapid growth of cheese production, since the late 80s of the last century, the work on obtaining milk coagulants by genetic engineering methods has started. Currently, the work continues in the way of searching for a new milk-coagulating enzymes. As a result of our work, a producer has been created, it provides production of recombinant chymosin Vicugna pacos. The main technological parameters are determined for the obtained preparation.

Chymosin is a digestive enzyme that belongs to the family of aspartic proteinases. It is synthesized in the mucous membrane of the mammals stomach and passes into the active form within acidic environment of gastric juice [1]. Milk is a complex biological fluid that contains proteins, fats, lactose, citric acid, and inorganic components. Most of the proteins in milk are kappa-casein [2]. By the chymosin influence the reoccurs a proteolytic cleavage of bond between the phenylalanine and the methionine of this protein and after its transition into an insoluble para-kappa-casein and soluble casein takes place. In the presence of Ca<sup>2+</sup>, calcium sensitive kappa-casein together with insoluble para-kappa-casein forms a milk clot. Nowadays, bovine recombinant chymosin is the main coagulant of milk in the industrial production of cheese, it has a standard milk-coagulating activity. However, a new milk-coagulating enzyme has recently been developed and it demonstrates improved technological characteristics. It was established that the consumption of recombinant chymosin of camel (*Camelus dromedarius*) is lower by 70-80% in comparison with recombinant chymosin of the cow [3]. Thus, the task of obtaining new recombinant chymosins with improved biochemical and technological indicators is still topical. Moreover, it's not about the modification of the recombinant chymosin of the cow, but about the search for new variants of other mammalian species chymosins.

During bioinformatic studies, to search for candidate chymosins with improved biochemical properties, sequences of prochymosins presented in GenBank were analyzed. As a result, the Vicugna pacos chymosin gene was selected and on its basis there was designed an expression cassette optimized for the E. coli system. A series of vectors containing the developed expression cassette was constructed, as well as a cassette containing the Bos Taurus chymosin gene (in our work acting as a control). On the basis of E. coli strain BL21 (DE3) there were developed producers of recombinant prochymosins Vicugna pacos and Bos Taurus. After optimizing the conditions of enzyme production, the obtained preparations of recombinant chymosins were characterized by the main technological and physicochemical parameters (heat stability, calcium sensitivity, milk-coagulating and total proteolytic activity).

*References:*

1 Takahashi K. Gene structures of pepsinogens A and C//Scand J. Clin. Lab. Invest. 1992. № 52. P. 97–110. 2) Fox P. F. Rennets and their action in cheese manufacture and ripening//Biotechnol Appl Biochem. 1988. № 10. P. 522–535. 3) Kappeler S. R., van den Brink H. J., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhon Z., Hansen E. B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk//Biochem Biophys Res Commun. 2006. № 342. P. 647–654.

**Grant:** The Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology. Program "Smart" № 12050ГУ/2017

УДК 632.938.2

## РАЗРАБОТКА СРЕДСТВА ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР ОТ КОМПЛЕКСА ПАТОГЕНОВ НА ОСНОВЕ БАВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Солохина И.Ю., Лушников А.В.

ФГБОУ ВО Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина, Орел, Россия  
302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69  
e-mail: obc1-2010@mail.ru

Получены средство защиты овощных культур от комплекса патогенов на основе БАВ природного происхождения. Показано, что использование данного средства приводит к снижению антибактериальной и антифунгальной активности распространенных патогенов овощных культур в малых концентрациях при обработке семян и при опрыскивании вегетирующих растений

**Ключевые слова:** средства защиты растений, овощеводство, БАВ природного происхождения, патогены

Овощеводство как закрытого, так и открытого грунта, терпит большие убытки, связанные с бактериальными и грибными заболеваниями растений. Большинство заболеваний имеет комплексную природу. Комплексные инфекции приводят к снижению урожайности овощных культур, а нередко и к гибели растений [1].

Применяемые в процессе вегетации фунгициды имеют несомненный положительный эффект, но они селективно воздействуют лишь на грибные патогены, не затрагивают фитопатогенные бактерии и тем самым освобождают им нишу. Распространение таких бактериальных заболеваний как бактериальная гниль, бактериальная пятнистость (возбудители *Glavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris* и многие другие) не менее опасны, чем распространение грибных болезней (возбудители *Fusarium oxysporum*, *Ascohyta* и др.).

Опыт применения бактерицидов показал, что после подавления бактериозов на поврежденных частях растений немедленно развивается грибная инфекция, для подавления которой необходимо применение соединений с противогрибковой активностью. Для защиты овощных культур необходимо применять средство, сочетающее фунгицидное и бактерицидное действие [2].

Целью данного исследования являлось создание средства, обеспечивающего одновременную защиту растений от грибных (фузариозных, аскохитозных и др.) и бактериальных инфекций. Создано средство, содержащее в качестве бактерицида БАВ растительного происхождения, а в качестве фунгицида – БАВ микробного происхождения.

Количественное соотношение составляющих средства подобрано экспериментальным путем в условиях *in vitro*. Компоненты средства по отдельности тестировались на микробиологическую активность в отношении ряда возбудителей грибных и бактериальных инфекций, выделенных с больных растений закрытого грунта.

Использование данного средства приводит к снижению антибактериальной и антифунгальной активности в малых концентрациях при обработке семян и при опрыскивании вегетирующих растений. В опытах *in vivo*, предлагаемое средство проявило высокую эффективность против аскохитоза огурца сразу после обработки. Биологическая эффективность при обработке зараженных растений исследуемым средством составила 74%, при обработке известным фунгицидом - 42%. Обработка растений огурца путем внесения в почву рабочего раствора средства снизило развитие болезни фузариозной корневой гнили огурца. Эффективность обработки заявляемым средством составила 38%, фитоспорином-М –

33%. При опрыскивании томатов, пораженных бурой пятнистостью, снизило количество больных растений. Эффективность обработки через две недели после обработки вегетирующих растений была больше, чем при обработке фитоспорином-М и достигла 74%. При внесении средства под корень, эффективность была выше – 82%. Дальнейшие наблюдения за растениями, вплоть до сбора урожая показали, что обработка семян и опрыскивание средством увеличивает урожайность огурцов и томатов в среднем в три раза.

Работа выполнена в ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» ФГБОУ ВО Орловский ГАУ по заказу Минсельхоза России за счет средств федерального бюджета по теме «Проведение научных исследований и агробиологическое обоснование интенсивной технологии выращивания овощной продукции с использованием биологических препаратов» в 2017 году.

*Литература:*

1. Коломиец Э.И. Средства биологического контроля патогенов растений и животных: подходы к повышению эффективности и конкурентоспособности // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. – Красноярск, 2007. – С. 155–170.
2. Монастырский О.А. Современные проблемы и решения создания биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от возбудителей болезней // Агро XXI. – 2009. – № 7. – С. 3–5.

UDC 632.938.2

## THE DEVELOPMENT TOOLS FOR THE PROTECTION OF VEGETABLE CROPS FROM A COMPLEX OF PATHOGENS ON THE BASIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF NATURAL ORIGIN

Gneusheva I. A., Pavlovskaya N. E. Solokhina I. Yu., Lushnikov A. V.

*Of the Orel state agrarian University. N. In. Parahina, Orel, Russia  
302019, Orel, Generala Rodina, 69  
e-mail: obc1-2010@mail.ru*

The resulting protection of vegetable crops from a complex of pathogens on the basis of biologically active substances of natural origin. It is shown that the use of the tool leads to a decrease in antibacterial and antifungal activity of common pathogens of vegetable crops in low concentrations in the processing of seeds and spraying of vegetating plants

**Key words:** plant protection, vegetable production, biologically active substances of natural origin, pathogens

Vegetable as closed and open ground, suffers large losses associated with bacterial and fungal diseases of plants. Most diseases have a complex nature. Complex infections reduce the yield of vegetable crops, and often to the death of plants [1].

Applied during the growing season, the fungicides have a definite positive effect, but they selectively affect only fungal pathogens do not affect phytopathogenic bacteria and thus liberate them niche. The spread of bacterial diseases like bacterial rot, bacterial leaf spot (causative agents *Glavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris* and many others) is no less dangerous than the spread of fungal diseases (pathogens *Fusarium oxysporum*, *Ascohyta*, etc.).

Experience with the use of microbicides showed that after the suppression of bacterial diseases in damaged plant parts immediately develops a fungal infection, to suppress which required the application of compounds with antifungal activity. To protect vegetable crops, it is necessary to apply the remedy that combines fungicidal and bactericidal action.

The aim of this study was to create tools that provide simultaneous protection of plants from fungal (*Fusarium*, *architonic*, etc.) and bacterial infections. Created a tool that contains as bactericide biologically active substances of plant origin, and as a fungicide – biologically active substances of microbial origin [2].

The quantitative ratio of the components of the remedies selected experimentally in vitro. Components tools individually tested for microbiological activity against a number of pathogens of fungal and bacterial infections selected from the diseased plants in greenhouses.

The use of this tool leads to a decrease in antibacterial and antifungal activity at low concentrations during the processing of seeds and spraying of vegetating plants. In in vivo experiments, the proposed tool showed high efficacy against the disease of cucumber immediately after processing. Biological efficiency when handling infected

plants of the studied medium was 74%, when processing a known fungicide - 42%. Treatment of cucumber plants by soil application of the working solution of the disinfectant reduced the disease development of Fusarium root rot of cucumber. The treatment efficiency of the inventive tool was 38%, Phytosporin-M – 33%. When spraying tomatoes affected by brown spot and reduced the number of diseased plant. The effectiveness of treatment after two weeks after the processing of vegetative plants was more than Phytosporin-M and reached 74%. When depositing funds at the root, the efficiency was higher – 82%. Further observation of the plants until harvest showed that the treatment of seeds and spraying means increases the yield of cucumbers and tomatoes in three times on average.

Work is performed in the shared research center "Orel regional centre of agricultural biotechnology" of the Orel state agricultural UNIVERSITY by order of the Ministry of agriculture at the expense of the Federal budget on "research and agrobiological substantiation of intensive technology of cultivation of vegetables using biological drugs" in 2017.

*References:*

1. Kolomiets E. I. means of biological control of pathogens of plants and animals: approaches to improving the effectiveness and competitiveness // *Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: collection of scientific works*. Tr. – Krasnoyarsk, 2007. – Pp. 155-170.
2. Monastic O. A. Modern problems and solutions of creation of biological products to protect crops from pathogens // *agro XXI*. – 2009. – No. 7. – С. 3-5.

УДК 663.031.2/.4.

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ И ИНГРЕДИЕНТОВ НА ОСНОВЕ ЗЕРНОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ

**Хромова Н. Ю., Сальникова А. Г., Кареткин Б. А., Гордиенко М. Г., Шакир И. В., Панфилов В. И.**

*Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1  
E-mail: khromova-natalya@bk.ru*

Разработана технология получения пробиотических функциональных продуктов на основе зерновых гидролизатов с высоким содержанием бифидобактерий. Обоснован выбор пшеничной муки в качестве сырья, выбраны протеолитические ферментные препараты (ФП). Оптимизированы условия предварительной обработки сырья. Проведено культивирование пробиотической культуры *B. adolescentis*, показана ее высокая продуктивность.

**Ключевые слова:** ферментативный гидролиз; зерновые культуры; бифидобактерии; функциональное питание.

В связи с повышенным вниманием потребителей к собственному здоровью, в последнее время широкое распространение получили функциональные продукты, в том числе содержащие пробиотики. Для снижения себестоимости продукции вместо дорогостоящего животного сырья для ферментационных процессов можно использовать возобновляемое растительное сырье [1-3]. Так, используемое в пищевых целях зерно можно применять для приготовления питательных сред для ферментации бифидобактерий. Ростовые свойства сред в данном случае будут обусловлены эффективностью предварительной обработки.

Исследован рост пробиотической культуры *Bifidobacterium bifidum* №1 на питательных средах на основе гидролизатов обойной ржаной муки и пшеничной муки высшего сорта, полученных обработкой ФП Панкреатин (Panreac) или Protex 40 E (Genencor) с добавлением дополнительных компонентов. Установлено, что показатели роста бифидобактерий в гидролизатах пшеничной муки выше, чем ржаной. При этом высокая продуктивность штаммов *Bifidobacterium bifidum* №1 (до 4,7×10<sup>8</sup> КОЕ/мл) и *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 (4×10<sup>7</sup> КОЕ/мл) отмечена при культивировании в средах на основе ферментализатов пшеничной муки высшего сорта, обработанных панкреатином, с добавлением глюкозы, дрожжевого экстракта, L-цистеина, аскорбиновой кислоты и минеральных солей.

С использованием методологии факторного эксперимента определены оптимальные условия процесса предварительной ферментативной обработки пшеничной муки панкреатином для культивирования *B. adolescentis* (гидромодуль 5.43, концентрация ФП 2 % от содержания протеина в муке (рис.

1)). Исследована кинетика роста бифидобактерий в гидролизате, полученном в оптимальных условиях (рис. 2). Экспериментально полученный титр бифидобактерий при оптимальных условиях обработки составлял  $3.0 \times 10^8$  КОЕ/мл на 12-14 ч ферментации, а удельная скорость роста 0.25 ч<sup>-1</sup>. По конечному титру бифидобактерий ростовые свойства среды, полученной на основе ферментализата пшеницы, были идентичны среде MRS. Проведено лиофильное высушивание суспензии, в результате которого получена биомасса с высоким содержанием живых бифидобактерий.

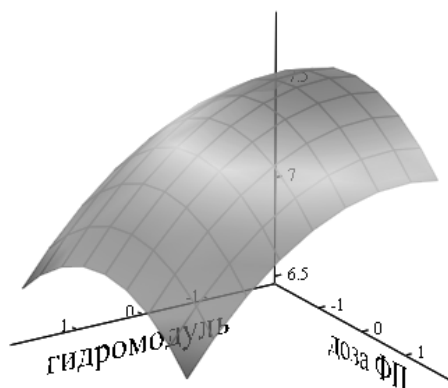


Рис. 1. Поверхность функции отклика  $\log(\text{КОЕ/мл})$  бифидобактерий на 24 ч ферментации на гидролизатах муки от гидро модуля и дозы ФП

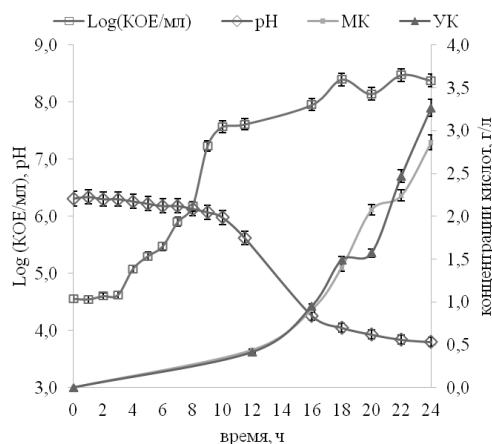


Рис. 2. Основные показатели роста бифидобактерий в гидролизатах пшеничной муки, полученных в оптимальных условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 16-19-10469.

#### Литература

- Charalampopoulos D., Pandiella S.S., Webb C. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates // *Journal of Applied Microbiology*. 2002. No.92. pp. 851–859.
- Radenkovs V., Klava D., Juhnevica K. Wheat bran carbohydrates as substrate for *Bifidobacterium lactis* development // *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 2013. Vol.7. No.7. pp. 605-610.
- Novik G. I., Wawrzynczyk J., Norrlow O., Szwajcer-Dey E. Fractions of Barley Spent Grain as media for growth of probiotic bacteria // *Microbiology*. 2007. Vol.76. No.6. pp. 902–907.

UDC 663.031.2/.4.

## DEVELOPMENT OF BASIC TECHNOLOGIES FOR PROBIOTIC FUNCTIONAL PRODUCTS AND INGREDIENTS BASED ON CEREAL HYDROLYSATES

**Khromova N. Yu., Sal'nikova A. G., Karetkin B. A., Gordienko M. G., Shakir I. V., Panfilov V. I.**

Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia  
125480, Moscow, Geroev Panfilovtsev st., 20  
E-mail: khromova-natalya@bk.ru

A technology has been developed to obtain probiotic functional products based on hydrolysates grains with high bifidobacteria content. The choice of wheat flour as a raw material was justified, and the proteolytic enzymes (OP) were selected. Raw materials preconditioning of was optimized. High productivity of *B. adolescentis* probiotic culture was shown during cultivation.

**Key words:** enzymatic hydrolysis; grain crops; Bifidobacteria; functional food.

Functional products, including those containing probiotics, are widely used today due to the increased consumer attention to their own health. Renewable vegetable raw materials can be used for fermentation processes instead of expensive animal raw materials to reduce the production cost. For example, the grain used for food purposes can be applied for the preparation of nutrient media for fermentation of bifidobacteria. The growth properties of the

media in this case depend on the efficient pre-processing of the substrate.

The growth of the probiotic *Bifidobacterium bifidum* No. 1 culture in the nutrient media, based on hydrolysates whole wheat rye flour and extra class wheat flour, processed with pancreatin (PANREAC) enzyme preparation or Protex 40 E (Genencor) with additional components. The growth rate of the bifidobacteria in hydrolyzed wheat flour was found to be higher than the rye. At the same time, the high productivity of *Bifidobacterium bifidum* No. 1 (Up to  $4.7 \times 10^8$ ) and *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 ( $4 \times 10^7$ /ml) strains was shown in the cultivation with grade wheat flour enzymatic hydrolysate processed with pancreatin and with glucose, yeast extract, L-cysteine, ascorbic acid and mineral salts added.

The optimum conditions for the enzymatic pretreatment of wheat flour with pancreatin for cultivation of *B. adolescentis* (water:solids ratio 5.43, enzyme concentration 2% of flour protein content (Figure 1)) was defined with the factor experiment methodology. The kinetics of bifidobacteria growth were studied in the hydrolysate obtained in optimum conditions (Figure 2). Under optimum processing conditions Bifidobacteria cell count was  $3.0 \times 10^8$  on 12-14 hours of fermentation, and the specific growth rate of 0.25 H<sup>-1</sup>. The growth properties of the medium obtained from wheat enzymatic hydrolysate were identical to the MRS environment by the final cell count of bifidobacteria. A freeze-drying suspension was carried out, resulting in a biomass with a high content of the living bifidobacteria.

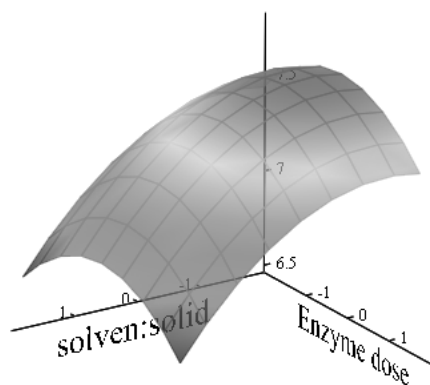


Figure. 1. Response function surface log(CFU/ml) bifidobacteria at 24th hour of fermentation on flour hydrolysates depending on the hydromodule and the dose of enzyme preparation.

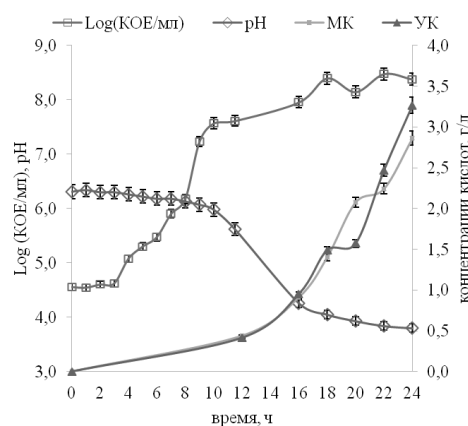


Figure. 2. The main indicators of bifidobacteria growth in the wheat flour hydrolysates obtained under optimum conditions.

The work was carried out with the financial support of the Russian Scientific Foundation, Grant No. 16-19-10469.

#### References:

- Charalampopoulos D., Pandiella S.S., Webb C. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates // *Journal of Applied Microbiology*. 2002. No.92. pp. 851–859.
- Radenkovs V., Klava D., Juhnevica K. Wheat bran carbohydrates as substrate for *Bifidobacterium lactis* development // *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 2013. Vol.7. No.7. pp. 605-610.
- Novik G. I., Wawrzynczyk J., Norrlow O., Szwajcer-Dey E. Fractions of Barley Spent Grain as media for growth of probiotic bacteria // *Microbiology*. 2007. Vol.76. No.6. pp. 902–907.

УДК: 641.563

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

С.Ю.Макарова, Г.Е.Рысмухамбетова, И.В.Ишмурзин, Н.А.Еремеева, Д.И.Галяутдинов

Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И.Вавилова, Россия, 410005, Саратов, Соколовая, 335, makarovasveta22@yandex.ru, 8-909-332-41-02

В данной работе были разработаны технологии кулинарной продукции функционального назначения с ис-

пользованием ксантановой и гуаровой камедей (0,1-1,3 %).

**Ключевые слова:** функциональное питание, функциональный продукт, камедь ксантановая, камедь гуаровая.

В настоящее время состояние здоровья населения Земли, по данным Всемирной организации здравоохранения ФАО ВОЗ, имеет тенденцию к ухудшению и характеризуется увеличением числа людей, страдающих различными заболеваниями, в том числе алиментарными [3]. Недостаток количества функциональных продуктов питания на российском рынке мы предлагаем компенсировать продуктами, обогащенными пищевыми волокнами.

Нами были разработаны технологии ряда функциональных продуктов с использованием полисахаридов (ПС) различной природы – камедь ксантановая и камедь гуаровая. По литературным сведениям, известно, что использование данных камедей имеет ряд особенностей и преимуществ [4].

В ходе исследований нами подобраны оптимальные концентрации полисахаридного компонента с помощью органолептической оценки разработанных блюд, для этого были взяты ПС в диапазоне концентраций от 0,1 до 1,3 %. В результате исследований нами были выбраны оптимальные концентрации ПС с наилучшими органолептическими показателями, а именно: суп-пюре из говяжьей печени с ПС 0,45-0,6 %; хлебцы рыбные с ПС 0,10-0,30 %; суфле куриное с ПС 1,30-0,80 %; соусы «Белый основной» с ПС 0,45-0,60 % и «Красный основной» с ПС 0,55-0,60 %. В образцах с наилучшими органолептическими характеристиками нами были определены физико-химические показатели. В результате выявлено, что в исследуемых продуктах содержание сухих веществ снижается на 10 – 48,8 % в сравнении с контролем. Исключением является «Хлебцы рыбные», в которых содержание сухих веществ увеличилось в среднем на 4 %. В тоже время нами было определено, что массовая доля жира в исследуемых продуктах уменьшилась на 7 - 59,1%. Кислотность во всех исследуемых изделиях также снизилась на 12 – 48,8 %, кроме соуса «Красный основной». В соусе «Красный основной» кислотность увеличилась в среднем на 12,3 %.

Также нами были определены микробиологические показатели исследуемых блюд, которые показали соответствие требованиям СанПиН 2.3 6.1079 01.

На основе данных таблицы химического состава российских продуктов питания были рассчитаны пищевая и энергетическая ценности разработанных блюд. В изучаемых кулинарных изделиях отмечено снижение калорийности в среднем на 15,5 %, и увеличение пищевых волокон в среднем на 113 % [2].

Таким образом, нами были разработаны технологии некоторых продуктов, которые можно использовать в функциональном питании.

#### Литература:

1. СанПиН 2.3 6.1079 01. Санитарно-эпидемиологические требования к организациям общественного питания, изготовлению и оборотоспособности в них пищевых продуктов и продовольственного сырья. 2. Скурихин И.М., Тутельян В.А. Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник. – М., ДеЛи принт, 2007. 236 с. 3. Тихомирова Н.А. Современное состояние и перспективы развития продуктов функционального питания // Молочная промышленность. – 2009. – №7. – С. 5-7. 4. Harris, P. A practical approach to polysaccharide analysis: Food Polysaccharides and their Application. – N.Y.: Marcel Dekker, 1995. – P. 463

UDC 641.563

## DEVELOPMENT OF A TECHNOLOGY OF POLYSACCHARIDE-BASED FUNCTIONAL PRODUCTS

**S.Makarova, G.Rysmukhambetova, I.Ishmurzin, N.Yeremeyeva, D.Galyautdinov**

Saratov State Vavilov Agrarian University, Russia, 410005, Saratov, Sokolovaya, 335

In this work, technologies for culinary products of functional purpose with the use of xanthan and guar gums (0.1-1.3%) were developed.

**Key words:** functional nutrition, functional product, xanthan gum, guar gum.

Currently, the health status of the world's population, according to the World Health Organization (WHO), tends to worsen, and the number of people suffering from various diseases, including nutritional ones, rises [3]. We propose to compensate for the lack of the amount of functional food products on the Russian market by products enriched with food fibers.



We have developed technologies for a number of functional products using polysaccharides (PS) of various types - xanthan gum and guar gum. According to the literature [4], the use of gums has a number of features and advantages.

In the course of our research, we selected optimal concentrations of the polysaccharide component with the help of an organoleptic evaluation of the dishes developed, PS were taken in a concentration range of 0.1% to 1.3% for this purpose. As a result of our research, we chose the following optimal concentrations of PS with the best organoleptic indicators: puree soup from beef liver with 0.45-0.6% PS; fish breads with 0.10-0.30% PS; chicken soufflé with 1.30-0.80% PS; the sauces "White basic" with 0.45-0.60% PS and "Red basic" with 0.55-0.60% PS. In the samples with the best organoleptic characteristics, we determined the physicochemical parameters. It is as a result revealed that in the studied products the content of solids decreases by 10 – 48,8% in comparison with control. The exception is "Fish bread", in which the content of dry substances increased by an average of 4%. In too time by us it has been defined that the mass fraction of fat in the studied products has decreased by 7 – 59,1%. The acidity in all studied products has also decreased by 12 - 48,8%, except for "The red basic" of sauce. In the "Red Base" sauce, the acidity increased by an average of 12.3%.

We also determined the microbiological parameters of the dishes studied, which showed compliance with the requirements of SanPiN 2.3 6.1079 01.

Based on the data from the chemical composition table of Russian food products. In the culinary products studied, there was a decrease in calorie content by an average of 15.5%, and an increase in dietary fiber by an average of 113 % [2].

Thus, we have developed the technologies of some products which can be used in functional nutrition.

#### References:

1. SanPiN 2.3 6.1079 01. Sanitary and epidemiologic requirements to the organizations of public catering, production and turnover ability in them of foodstuff and food staples [Russ]. 2. I.M. Skurikhin and V.A. Tutelyan. Chemical composition of Russian food products: Handbook. - Moscow, DeLi print, 2007. 236 p. [Russ] 3. N.A. Tikhomirova. Current status and prospects for the development of functional food products // Dairy industry. - 2009. - No. 7. - P. 5-7. [Russ] 4. P. Harris. A practical approach to polysaccharide analysis: Food Polysaccharides and their Application. - N.Y.: Marcel Dekker, 1995. - 463 p.

УДК 579.672

## СКРИНИНГ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПОЛИКОМПОНЕНТНОГО КОНСОРЦИУМА

**Волкова Г.С., Кукова Е.В., Фурсова Н.А., Кривова А. Ю., Римарева Л.В.**

*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, 4б, galina.volkova@bk.ru*

**Аннотация.** Проведен скрининг штаммов молочнокислых бактерий по уровню синтеза молочной кислоты и бактериоцинов, на основе которых создан консорциум для технологий переработки растительного сырья в биологически активные добавки.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, бактериоцины, биосинтез, консорциум.

С целью получения биологически активных добавок на основе консорциумов молочнокислых бактерий провели скрининг штаммов по признаку наибольшего накопления в культуральной жидкости молочной кислоты и бактериоцинов.

Для отбора культур микроорганизмов использовали среду МРС. Содержание молочной кислоты определяли методом ВЭЖХ, уровень накопления бактериоцинов определяли с использованием как стандарта препарата низина.

Результаты по отбору штаммов-продуцентов представлены на рис.1.

1 – <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1660/08	7 – <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> 17
2 – <i>L. acidophilus</i> 1660/15	8 – <i>L. delbrueckii</i> 1596/3 (T)
3 – <i>L. acidophilus</i> var. <i>coccoideus</i> M-94/2	9 – <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 33
4 – <i>L. plantarum</i> 314	10 – <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 24/48
5 – <i>L. plantarum</i> 578/25	11 – <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 119/05
6 – <i>L. plantarum</i> 578/26	12 – <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1500/12

Рис.1 Отбор культур продуцентов органических кислот и бактериоцинов (на 48 часов роста).

Из данных таблицы видно, что наиболее эффективно процесс кислотообразования и накопления бактериоцинов осуществляют культуры *Lactobacillus acidophilus* 1660/15, *Lactobacillus plantarum* 578/25, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1500/12. Эти культуры были отобраны как перспективные штаммы для дальнейших исследований.

На основании экспериментальных исследований создан консорциум из отобранных штаммов молочнокислых бактерий. При совместном культивировании консорциума в культуральной жидкости накапливаются L-молочная кислота, растворимые белки, каталазно-пероксидазные и лактатдегидрогеназные комплексы [1,2]. Кроме того, обнаружены цитохромоксидазные системы, а также витамины группы В.

Далее провели количественное определение количества синтезируемых бактериоцинов на среде МРС. Культивирование проводили в течение 120 час. при 370С, доза засева 10% 24-суточной культурой посевного материала. Контролем служил очищенный коммерческий препарат низаплина в концентрации 12,5 мг/л (табл.1).

Таблица 1 - Количество бактериоцинов, образуемых отобранными штаммами

Культура	Количество бактериоцинов, мг/дм <sup>3</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> 578/25	7,91
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 1500/12	4,27
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1660/15	8,25

В дальнейших исследованиях установлено, что при совместном культивировании отобранных штаммов количество бактериоцинов может быть увеличено методом оптимизации питательной среды [3] и подбором условий культивирования.

Данное исследование выполнено в рамках госзадания по теме № 0529-2016-0047.

Литература:

1. Kozaki M., Uchimura T., Okada S. *Experimental manual of lactic acid bacteria*. – Tokyo, 1992. – P.34–37.
2. Карапетян Д. Сравнительная оценка ряда свойств новых штаммов молочнокислых бактерий / Биолог. журн. Армении, 4 (61), - 2009, - С. 36-42.
3. Ботина С. Г. Молекулярно-биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии / Автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора биол. наук, Москва, - 2011, - С. 48.

UDC 579.672

## SCREENING OF HIGHLY PRODUCTIVE STRAINS OF LACTIC BACTERIA FOR CREATION OF MULTICOMPONENT CONSORTIUM

Volkova G.S., Kuksova E.V., Fursova N.A., Krivova A. Yu., Rimareva L.V.

The All-Russian Research Institute of food biotechnology – branch of Federal state budgetary institution of science of the Federal research center of food, biotechnology and safety of food  
Moscow, Russia

111033, Moscow, Samokatnaya St., 4b, galina.volkova@bk.ru

Screening of strains of lactic bacteria on the level of synthesis of lactic acid and bacteriocins on the basis of which the consortium for technologies of processing of vegetable raw materials in dietary supplements is created is carried out.

**Key words:** lactic bacteria, bacteriocins, biosynthesis, consortium.

For the purpose of receiving dietary supplements on the basis of consortia of lactic bacteria have carried out

screening of strains on the basis of the greatest accumulation in cultural liquid of lactic acid and bakterioticsin.

For selection of cultures of microorganisms used the MRS environment. Content of lactic acid was determined by the VEZH method, the level of accumulation of bakterioticsin was determined with use as standard of medicine the lowland.

Results on selection of strains producers are presented in fig. 1.

1 - Lactobacillus acidophilus 1660/08	7 – L. casei subsp. casei 17
2 – L. acidophilus 1660/15	8 – L. delbrueckii 1596/3 (T)
3 – L. acidophilus var. coccoideus M-94/2	9 – L. delbrueckii subsp. bulgaricus 33
4 – L. plantarum 314	10 – L. lactis subsp. lactis 24/48
5 – L. plantarum 578/25	11 – L. lactis subsp. lactis 119/05
6 – L. plantarum 578/26	12 – L. lactis subsp. lactis 1500/12

Fig. 1 Selection of cultures of producers of organic acids and bacteriocines (for 48 hours of body height).

From data of the table it is visible that most effectively process of a kisloobrazovaniye and accumulation of bacteriocines carry out the cultures of Lactobacillus acidophilus 1660/15, Lactobacillus plantarum 578/25, Lactococcus lactis subsp. lactis 1500/12. These cultures were selected as perspective strains for further researches.

On the basis of pilot studies the consortium from the selected strains of lactic bacteria is framed. At joint cultivation of consortium in cultural liquid L-lactic acid, soluble proteins, katalazno-peroksidazny and laktatdegidrogenazny complexes collect [1,2]. Besides, tsitokromoksidazny systems and also group B vitamins are found.

Further carried out quantitative determination of quantity of synthesizable bacteriocines on medium of MRS. Cultivation was carried out during 120 hours at 370C, a dose of sowing of 10% by the 24-day culture of sowing material. As control served the purified commercial drug of a nizaplin in concentration of 12,5 mg/l (tab. 1).

Table 1 - Quantity of the bacteriocines formed by the selected strains

Strain	Quantity of bakterioticsin, mg/dm <sup>3</sup>
Lactobacillus plantarum 578/25	7,91
Lactococcus lactis subsp. lactis 1500/12	4,27
Lactobacillus acidophilus 1660/15	8,25

In further researches it is established that at joint cultivation of the selected strains the quantity of bakterioticsin can be increased by method of optimization of nutrient medium [3] and selection of conditions of cultivation.

This research is executed within a state task on a subject No. 0529-2016-0047.

#### References:

1. Kozaki M., Uchimura T., Okada S. *Experimental manual of lactic acid bacteria*. – Tokyo, 1992. – P.34–37.
2. Karapetyan D. *Comparative assessment of a number of properties of new strains of lactic bacteria / Biologist. журн. Armenia, 4 (61), - 2009, - Page 36-42.*
3. Botina S. G. *Molecular and biological approaches to selection of bacterial cultures during creation of ferments for biotechnology / Avtoref. yew. on a competition Wuchang. doctor's degrees биол. sciences, Moscow, - 2011, - Page 48.*

УДК 579.083.13: 579.25

## СТАБИЛИЗАЦИЯ АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ЖИДКИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

**Чижаева А.В., Дудикова Г.Н., Амангельды А.А., Бутыркина Н.П.**

Казахский научно-исследовательский институт перерабатывающей и пищевой промышленности, Алматы, Казахстан  
050060, Алматы, пр. Гагарина, 238 «Г», E-mail: anna\_chizhaeva@mail.ru

Показана возможность повышения и стабилизации антагонистических свойств молочнокислых бактерий в жидких микробиологических препаратах в течение 5 месяцев путем введения в их состав сорбента - кремнийсодержащей стимулирующей добавки.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, антагонизм, микробиологический препарат, стабилизация свойств

Для обеспечения нормальной жизнедеятельности микрофлоры при создании микробиологического препарата необходимы полноценная питательная среда и оптимальные условия приготовления препарата. Известно, что различные сорбенты также могут оказывать стимулирующее и стабилизирующее действие на микрофлору микробиологических препаратов и заквасок.

При создании микробиологического препарата на основе консорциума *Lactobacillus pontis* 67, *Lb. paracasei* 35, *Lb. casei* KC1, *Pediococcus acidilactici* РЖ-1 с целью повышения и стабилизации количества клеток молочнокислых бактерий (МКБ) и их антагонистической активности в отношении *B. subtilis* и плесневых грибов нами проводилось исследование возможности введения в состав жидких питательных сред стимулятора роста, обладающего сорбционными характеристиками - кремнийсодержащей добавки (в концентрациях 50 мг/100мл, 100 мг/100мл, 500 мг/100мл, 750/100 мл). Кремнийсодержащую стимулирующую добавку получали из рисовой шелухи и хелатирующего вещества катехинового типа (зеленый чай), подвергнутых механохимической активации. Показано, что кремнийсодержащая добавка не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность культур МКБ, более того, введение ее в мучную среду в количестве 500 мг/100мл способствует повышению титра МКБ до 10<sup>11</sup> КОЕ/мл и проявлению наибольшей антагонистической активности консорциума МКБ - 26 мм (диаметр зоны подавления роста *Bacillus subtilis* ATCC 6633 - тест культуры для определения антибиотической активности). Культуральные жидкости, содержащие клетки МКБ и кремнийсодержащую добавку были заложены на хранение при 6 °С для оценки стабилизирующего эффекта стимулятора роста и определения оптимального количества сорбента при хранении в течение 5 месяцев. Установлено, что наибольшим стабилизирующим эффектом кремнийсодержащая стимулирующая добавка обладает также в концентрации 500 мг/100 мл. Она способствует сохранению количества жизнеспособных клеток консорциума МКБ в жидком препарате на уровне 10<sup>11</sup> КОЕ/мл и повышению его антагонистической активности до 27 мм (за счет накопления продуктов метаболизма) в течение 5 месяцев.

Таким образом, применение кремнийсодержащей стимулирующей добавки в составе жидкой питательной среды при получении микробиологических препаратов способствует повышению и стабилизации в течение 5 месяцев количества клеток молочнокислых бактерий и их антагонистической активности в отношении *B. subtilis* и плесневых грибов.

UDC 579.083.13: 579.25

## STABILIZATION OF ANTAGONISTIC PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA IN FLUID MICROBIOLOGICAL PREPARATIONS

Chizhayeva A.V., Dudikova G.N., Amangeldi A.A., Butyrkina N.P.

*The Kazakh research institute of the processing and food industry, Almaty, Kazakhstan  
050060, Almaty, Gagarin Ave., 238 "G", E-mail: anna\_chizhaeva@mail.ru*

The possibility of increase and stabilization of antagonistic properties of lactic acid bacteria in fluid microbiological preparations within 5 months by introduction to their structure of the sorbent - the siliceous stimulating additive is shown.

**Key words:** lactic acid bacteria, antagonism, microbiological preparation, stabilization of properties

Full-fledged medium and optimum conditions of preparation's production are necessary for ensuring normal activity of a microflora during creation of microbiological preparation. It is known that various sorbents can also have the stimulating and stabilizing effect on a microflora of microbiological preparations and starters.

During creation of microbiological preparations on the basis of consortium *Lactobacillus pontis* 67, *Lb. paracasei* 35, *Lb. casei* KC1, *Pediococcus acidilactici* RZh-1 for the purpose of increase and stabilization of quantity of lactic acid bacteria cells (LAB) and their antagonistic activity concerning *B. subtilis* and mold fungi us was conducted the research of a possibility of introduction to composition of fluid nutrient mediums of the growth factor possessing getter characteristics - siliceous additive (in concentration of 50 mg / 100ml, 100 mg / 100ml, 500 mg / 100ml, 750/100 ml). The siliceous stimulating additive was received from the rice peel and chelating substance of catechin type (green tea) subjected to mechanochemical activation. It is shown that siliceous additive do not exert the negative impact on viability of LAB cultures, moreover, introduction it on flour medium in number of 500 mg / 100ml promotes increase in the titre of LAB to 10<sup>11</sup> CFU/ml and to manifestation of the greatest antagonistic activity of LAB consortium to 26 mm (diameter of suppression growth zone of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 - the test culture for determination of antibiotic activity). The cultural liquids containing cells of LAB and siliceous additive were put on storage at 6 °C for assessment of the

stabilizing effect of the growth factor and determination of optimum quantity of the sorbent at storage within 5 months. It is established that the siliceous stimulating additive has the greatest stabilizing effect also in concentration of 500 mg / 100 ml. It promotes maintaining quantity of viable cells of LAB consortium fluid preparation at the level of 10<sup>11</sup>CFU/ml and to increase in its antagonistic activity to 27 mm (due to accumulation of metabolism products) within 5 months.

Thus, use of the siliceous stimulating additive in fluid medium when receiving microbiological preparation promotes increase and stabilization within 5 months of cells quantity of lactic acid bacteria and their antagonistic activity concerning *B. subtilis* and mold fungi.

УДК 544.3.03: 544.032: 544.77

## **СТРУКТУРНЫЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ, ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ИЗОЛЯТОМ СЫВОРОТОЧНЫХ БЕЛКОВ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЛИПИДОВ В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ IN VITRO**

**Хурумова А. А., Ганзориг Г. <sup>1</sup>, Гуреева М. Д. <sup>1</sup>, Ульянов Д. С. <sup>1</sup>, Чеботарёв С. Д. <sup>1</sup>, Зеликина Д. В. <sup>2</sup>, Антипова А. С. <sup>2</sup>, Мартиросова Е. И. <sup>2</sup>, Медведева И. Б. <sup>2</sup>, Семёнова М. Г. <sup>2</sup>.**

<sup>1</sup> *Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия. 125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9*

<sup>2</sup> *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия 119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4, E-mail: shurf116@gmail.com*

Определены структурные и термодинамические параметры комплекса изолята сывороточных белков молока (ИСБ) и биологически активных липидов (фосфатидилхолина (ФХ) с незаменимой омега-3 альфа-линоленовой кислотой (АЛК)), контролирующие их высвобождение в модельных условиях желудочно-кишечного тракта *in vitro*.

**Ключевые слова:** липиды, изолят сывороточных белков молока, структура, термодинамические параметры, высвобождение, модельное переваривание *in vitro*.

В данном исследовании наше внимание было сфокусировано на выяснении основных взаимосвязей между структурными изменениями комплексных частиц (ИСБ - ФХ - АЛК) и высвобождением инкапсулированных липидов на каждой стадии их ферментативного переваривания в модельных условиях желудочно-кишечного тракта *in vitro*. При этом методом многоугольного лазерного светорассеяния измерялись как структурные (молярная масса, размер, плотность, архитектура), так и термодинамические (сродство к растворителю) параметры комплексов. Количественное определение высвободившихся липидов проводили аналитическими методами, используя спектрофотометрию. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (РФФИ), Грант 18-316-00111.

UDK 544.3.03: 544.032: 544.77

## **STRUCTURAL AND THERMODYNAMIC PARAMETERS UNDERLYING THE RELEASE OF THE ENCAPSULATED BY WEY PROTEIN ISOLATE BIOLOGICALLY ACTIVE LIPIDS IN THE GASTRO-INTESTINAL TRACT IN VITRO**

**Hurumova A.A. <sup>1</sup>, Ganzorig G. <sup>1</sup>, Gureeva M. D. <sup>1</sup>, Ulyanov D.S. <sup>1</sup>, Chebotarev S. A. <sup>1</sup>, Zelikina D. V. <sup>2</sup>, Antipova A. S. <sup>2</sup>, Martirosova E. I. <sup>2</sup>, Medvedeva I. B. <sup>2</sup>, Semenova M. G. <sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *D. I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia 125047 Moscow, Miusskaya sq., 9*

<sup>2</sup> *N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia 119334 Moscow, Kosygin str., 4, E-mail: shurf116@gmail.com*

The structural and thermodynamic parameters have been determined for the complex of whey protein isolate (WPI) and biological active lipids (phosphatidylcholine (PC) with essential omega-3 alpha - linolenic acid (ALA)), which control the release of the lipids in the gastrointestinal tract *in vitro*.

**Key words:** lipids, whey protein isolate, structure, thermodynamic parameters, release, digestion in vitro

In this study our attention was focused on the elucidation of the basic relationships between the structural transformation of the complex particles (WPI – PC – ALA) and the release of the encapsulated lipids at each stage of their enzymatic digestion simulated in vitro. The method of multiangle laser light scattering was used for the measurement of both structural (molar mass, size, density, architecture) and thermodynamic (thermodynamic affinity for an aqueous medium) parameters of the complex particles. The released amount of the lipids was determined by analytical methods using spectrophotometry.

This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), grant 18-316-00111.

УДК 664.8.047; 616.34-008.6

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ИНСТАНТНЫХ КОМПОЗИТНЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ЭНТЕРОСОБЦИИ И НУТРИТИВНОЙ ПОДДЕРЖКИ

Демидова Т. И., Юдина Т.П., Андрейко В. С.

Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия 125315, Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

e-mail: DemidonaTI@mgupp.ru

Эффективность использования инстантных специализированных композитных смесей в качестве энтеросорбента обусловлена содержанием пектиновых веществ (5-7%), а сбалансированность белково-углеводного комплекса и наличие таких важных иммунокорректоров, как аргинин и глутаминовая кислота, пробиотик метаболитного типа определяют нутритивную поддержку.

**Ключевые слова:** одномоментное применение энтеросорбции и нутритивной поддержки, кишечная эндотоксикация, энтеральное применение, эндоэкологическая реабилитация.

Разработка функциональных и специализированных пищевых продуктов зачастую приводит к получению композитных пищевых смесей, и их создание является актуальным научно-практическим аспектом.

Среди таких важных факторов, как полноценное обеспечение в конечном продукте физиологически активных пищевых веществ, регуляторных, информационно-сематических, сенсорных и других свойств, следует отметить наличие высокой биологической активности продукта, которая в свою очередь актуальна при ликвидации дефицита недостаточности питания.

Нарушение питания сопровождается кишечной эндогенной интоксикацией. В этом случае наиболее эффективна энтеросорбция и нутритивная поддержка. Энтеросорбция, так же используется как компонент комплексного воздействия при профилактике, оздоровлении, эндоэкологической реабилитации [1, 2].

В этой связи, идея использования энтеросорбента в составе специализированных инстантных композитных смесей (СИКС) заключается в предотвращении или ослаблении токсико-аллергических реакций, коррекции обменных процессов, восстановлении целостности и проницаемости слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, и соответственно оптимизации пищеварения.

Технология производства СИКС основывается на обобщенной технологической схеме производства: экстрагирования биологически активных веществ из вторичного пектиносодержащего сырья и элиминации экстрактивных веществ не имеющих функционального действия подготовку компонентов на основе вторичных сырьевых ресурсов; внесение в купажируемые экстракты дополнительных ингредиентов (белковых гидролизатов, или пробиотика метаболитного типа из бактериальных взвесей лактобактерий *Lactobacillus helveticus* NK1 и бифидобактерий *Bifidobacterium longum* В 379М и др.) сгущение и обезвоживание распылением или сублимацией.

Сорбционную активность СИКС определяют: большая сорбирующая поверхность компонентов за счет физической формы высокодисперсного порошка, гидрофильность не менее 1/10-15, содержания пектинов 4-5%. Нутритивные возможности определяются пищевой ценностью по углеводам, белкам, про- и витаминам, микроэлементам. Высокая антиоксидантная активность СИКС обусловлена содержанием полифенольных соединений, обладающих Р-витаминной активностью.

Эффективность применения данной группы продуктов подтверждена клиническими испытаниями в

ГКБ №50, ГКБ №81 и Больницы Центросоюза РФ.

В клинических условиях препараты СИКС применяли через назоинтестинальный зонд курсом 5-7 суток. Оценивали морфологию слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта до и после лечения. Восстановление морфологической структуры слизистой оболочки тонкой кишки на 7-е сутки при обычном лечении отмечено у 50% больных, при лечении с применением СИКС у 80%, – т.е. чаще в 1,6 раза, что характеризует эффективность энтерального применения препарата, обладающего антисептическими, противовоспалительными и репаративными свойствами.

*Литература:*

1. Попова Т.С., Тамашовили Т.Ш., Шестопалов А.Е., Лейдерман И.Н. Нутритивная поддержка больных в критических состояниях. М., «М-Вести», 2002, 320 с.
2. Ткаченко Е. И., Успенский Ю. П. Питание, микробиоценоз и интеллект человека / СПбю: Спц. Лит. 2006. с. 202-318.

UDC 664.8.047; 616.34-008.6

## THEORETICAL AND PRACTICAL ASPECTS OF DESIGNING SPECIALIZED INSTANTONS COMPOSITE MIXTURES FOR ENTEROCOCCI AND NUTRITIONAL SUPPORT

**Demidova T. I., Yudina T. P., Andreiko V. S.**

*Moscow state University of food production, Moscow, Russia 125315, Moscow, Volokolamsk highway, 11  
e-mail: DemidonaTI@mgupp.ru*

The effectiveness of the use of instant specialized composite mixtures as an enterosorbent is due to the content of pectin substances (5-7%), and the balance of the protein-carbohydrate complex and the presence of such important immunocorrectors as arginine and glutamic acid, probiotic metabolic type determine nutritive support

**Key words:** single-stage application of enterosorption and nutritional support, intestinal endogenous intoxication, enteral application, endoecological rehabilitation.

The development of functional and specialized food products often leads to the production of composite food mixtures, and their creation is a relevant scientific and practical aspect

Among such important factors as the full provision in the final product of physiologically active nutrients, regulatory, informational and semantic, sensory and other properties, it is necessary to note the presence of high biological activity of the product, which in turn is relevant in the elimination of malnutrition.

Eating disorders are accompanied by intestinal endogenous intoxication. In this case, the most effective enterosorption and nutritional support. Enterosorption is also used as a component of complex effects in prevention, rehabilitation, and endoecological rehabilitation [1, 2].

In this regard, the idea of using enterosorbent in the composition of specialized instant composite mixtures (SICM) is to prevent or reduce toxic-allergic reactions, correction of metabolic processes, restore the integrity and permeability of the mucous membranes of the gastrointestinal tract, and accordingly optimize digestion.

The production technology of SICM is based on the generalized technological scheme of production: extraction of biologically active substances from secondary pectin-containing raw materials and elimination of extractive substances with no functional effect preparation of components on the basis of secondary raw materials; introduction of additional ingredients into blended extracts (protein hydrolysates, probiotic or metabolite type of bacterial suspensions of lactic acid bacteria of *Lactobacillus helveticus* NK1 and bifidobacteria *Bifidobacterium longum* B 379M etc.), thickening and dehydration by spray or freeze-drying.

Sorption activity of the SICM is determined by: a large sorbing surface of the components due to the physical form of a highly dispersed powder, hydrophilicity of at least 1/10-15, the content of pectins of 4-5%. Nutritive possibilities are determined by nutritional value of carbohydrates, proteins, Pro - and vitamins, minerals. High antioxidant activity of SYKS is due to the content of polyphenolic compounds with P-vitamin activity

The effectiveness of this group of products is confirmed by clinical tests in the clinical hospital No. 50, of the clinical hospital №81 and the Hospital Centrosoyuz of the Russian Federation.

In clinical conditions, SICM drugs were used through a nasointestinal probe with a course of 5-7 days. We evaluated the morphology of the mucosa of the gastrointestinal tract before and after treatment. Restoration of the morphological structure of the small intestine mucosa on the 7th day in the usual treatment was noted in 50%

of patients, in the treatment with the use of SICM in 80% – i.e. more often than 1.6 times, which characterizes the effectiveness of enteral drug with antiseptic, anti-inflammatory and reparative properties.

*References:*

1. Popova T. S., Tamazashvili T. Sh., Shestopalov A. E., Leiderman I. N. *Nutritional support of patients in critical conditions*. M., "m-Vesti", 2002, 320 p.
2. Tkachenko E. I., Uspensky Yu. p. *Nutrition, microbiocenosis and human intelligence / SPb: SPC. Lit. 2006. C. 202-318.*

УДК 663.52

## ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО КРАХМАЛСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ НА ЭТИЛАЦЕТАТ И КОРМОПРОДУКТЫ

**Туршатов М.В., Соловьев А.О., Кононенко В.В., Леденев В.П., Кривченко В.А., Моисеева Н.Д., Кириллов Е.А.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи  
111033, г. Москва, ул. Самокатная, д. 4-Б.  
e-mail: lab78@mail.ru.*

Проведены исследования по созданию технологии получения этилацетата из растительного сырья с одновременным получением белково-углеводного кормопродукта. Разработанная технология позволяет перепрофилировать простаивающие спиртовые заводы на выпуск этилацетата с минимальными капитальными затратами.

**Ключевые слова:** Этилацетат, этилацетат-сырец, этерификационная колонна, эфировода, культуральная жидкость, белково-углеводные кормопродукты.

Этилацетат востребован многими отраслями, так как имеет широкую область применения: как растворитель в производстве лакокрасочных материалов, чернил и клея, как обезжиривающий и экстрагирующий агент в химической, пищевой и других отраслях промышленности. Ранее этилацетат производился в России на заводах лесохимической промышленности из вторичного сырья переработки древесины. Однако в настоящее время по целому ряду причин (экологических, экономических, нормативно-правовых) его производство на данных заводах практически не осуществляется. Значительная часть этилацетата поступает по импорту. В то же время насчитывается большое количество простаивающих спиртовых заводов, которые можно модернизировать с минимальными инвестициями на выпуск этилацетата из крахмалсодержащего сырья. При переработке зернового сырья на этилацетат в значительных количествах образуются отходы, содержащие некрахмалистую часть зерна и микробную биомассу, которые при соответствующей переработке могут использоваться в качестве белково-углеводных кормопродуктов[1]. В отличие от классической технологии получения этилацетата, где основным сырьем является товарный этиловый спирт[2,3], были проведены исследования по использованию в качестве сырья дистиллятов культуральной жидкости, полученной путем биоконверсии углеводов растительного сырья дрожжевыми микроорганизмами. Проведенные исследования свидетельствуют о возможности получения этилацетата-сырца концентрацией 87-90% при использовании в качестве сырья дистиллята культуральной жидкости крепостью 60-65% об. Доведение этилацетата-сырца до товарных кондиций осуществляется на дегидратационной колонне. Здесь же происходит отбор сивушной фракции из куба колонны. Также проведены исследования по влиянию возврата эфироводы (отхода производства этилацетата) в передаточную емкость культуральной жидкости на показатели чистоты товарного продукта. Результаты показали, что данный прием практически не влияет на качественные показатели товарного этилацетата (концентрация, цветность)[4,5]. Кроме того, возврат эфироводы исключает возможность получения из культуральной жидкости этилового спирта для производства спиртных напитков. Анализ технологического оборудования простаивающих спиртовых заводов показал, что при доукомплектации цеха БРУ узлом этерификации и соответствующей переобвязке операционных колонн, на них возможно получение этилацетата высшего сорта в соответствии с требованиями ГОСТ 8981-78.

Работа по подготовке рукописи проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук



на 2013-2020 годы (№ 0529-2015-0109).

*Литература:*

- 1 Туршатов М.В., Моисеева Н.Д., Кривченко В.А., Соловьев А.О., Кононенко В.В., Леденев В.П. Получение высококачественных сухих кормопродуктов из ВСП зерноперерабатывающих предприятий // Пищевая промышленность: Пиво и напитки. 2016. № 1. С. 22-25.
2. Шульгин Ю.Н., Билюба В.Ф. Производство ацетатных растворителей в лесохимической промышленности // М.: Лесная промышленность. С.1984 240
3. Выродов В.А., Кислицин А.Н., Глухарева М.И. Технология лесохимических производств // М.: Лесная промышленность. 1987 – С. 284
4. ГОСТ 8981-78 «Эфиры этиловый и нормальный бутиловый уксусной кислоты технические. Технические условия»
5. Гаврилова Д.А., Абрамова И.М., Медриш М.Э., Поляков В.А. Определение органических кислот в зерновом сусле и бражке методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // в сборнике: Основы здорового питания и пути профилактики алиментарно-зависимых заболеваний Сборник материалов Школы молодых ученых. 2016.

UDC 663.52

## TECHNOLOGY OF PLANT STARCH-CONTAINING RAW MATERIAL PROCESSING FOR ETHYL ACETATE AND FODDERS

**Turshatov M.V., Solovyov A.O., Kononenko V.V. , Ledenev V.P. Krivchenko V.A., Moiseeva N.D., Kirillov E.A.**

*All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology-a branch of the Federal State Budget Institution «Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety», Moscow, Russia.111033, Moscow, ul. Samokatnaya, d. 4-B.  
tel. 8 (495) 361-71-90, e-mail: lab78@mail.ru*

Researches have been carried out on the creation of a technology for obtaining ethyl acetate from vegetable raw materials with the simultaneous production of protein-carbohydrate feed products. Developed technology makes it possible to refigure idle distilleries for the production of ethyl acetate with minimal investment.

**Key words:** ethyl acetate, raw ethyl acetate, esterification column, ethyl acetate containing waste water, fermentation broth, protein-carbohydrate feed products.

Ethyl acetate is in demand in many industries, as it has a wide field of application: as a solvent in paints, inks and glues production, as a degreasing and extracting agent in the chemical, food and other industries. Earlier, ethyl acetate was produced in Russia at the wood-chemical industry plants from recycled wood processing raw materials. However, at present, for a number of reasons (ecological, economic, regulatory), production at these plants is practically not carried out. A significant portion of ethyl acetate is imported. At the same time, there are a large number of idle alcohol factories, which can be upgraded with minimal investment in the production of ethyl acetate from starch-containing raw materials. When grain raw materials is processing for ethyl acetate, considerable quantities of waste containing non-starchy part of the grain and microbial biomass are formed. This waste can be used as protein-carbohydrate feed products after appropriate processing [1]. In contrast to the classical technology of obtaining ethyl acetate, where the main raw material is commercial ethyl alcohol [2,3], studies were carried out on the use as feedstock of a culture liquid distillates obtained by bioconversion of vegetable carbohydrates by yeast microorganisms. The conducted researches indicate the possibility of obtaining raw ethyl acetate 87-90% concentration when using a fermentation broth distillate as a raw material with a strength of 60-65% vol. The adjustment of raw ethyl acetate to the commodity conditions is carried out on the dehydration column. The fusel fraction is separated from the cube of the same column. Also have been carried out research work on the effect of the recycling of waste product from ethyl acetate production to the fermentation liquid tank on the purity of the commercial product. The results showed that this method practically does not affect the qualitative indices of commercial ethyl acetate (concentration, chromaticity) [4,5]. In addition, the recycling of waste water which contains ethyl acetate eliminates the possibility of producing beverage ethanol from the fermentation liquid. The analysis of technological equipment from idle alcohol plants showed that with the additional assembly of brew-purification department with the esterification unit and the corresponding reassembly of the operating columns, it is possible to obtain premium grade ethyl acetate in accordance with the requirements of GOST 8981-78.

Research work on the preparation of the manuscript was carried out at the expense of subsidies for the

implementation of the state task in the framework of the Program of Fundamental research of the state academies of sciences for 2013-2020 (№ 0529-2015-0109).

#### References:

1. Turshatov M.V., Moiseeva N.D., Krivchenko V.A., Solov'ev A.O., Kononenko V.V., Ledenev V.P. Poluchenie vysokokachestvennyh suhih kormoproductov iz VSR zernopererabatyvajushhih predpriyatij // Pishhevaja promyshlennost': Pivo i napitki. 2016. № 1. S. 22-25.
2. Shul'gin Ju.N., Biljuba V.F. Proizvodstvo acetatnyh rastvoritelej v lesohimicheskoj promyshlennosti // M.: Lesnaja promyshlennost'. S. 1984 240
3. Vyrodov V.A., Kislicin A.N., Gluhareva M.I. Tehnologija lesohimicheskikh proizvodstv // M.: Lesnaja promyshlennost'. 1987 – S. 284
4. GOST 8981-78 «Jefiry jetilovyy i normal'nyj butilovyy uksusnoj kisloty tehicheskie. Tehicheskie uslovija»
5. Gavrilova D.A., Abramova I.M., Medrish M.Je., Poljakov V.A. Opredelenie organicheskikh kislot v zernovom susle i brazhke metodom vysokojeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii // v sbornike: Osnovy zdorovogo pitaniya i puti profilaktiki alimentarno-zavisimyh zabolevanij Sbornik materialov Shkoly molodyh uchenyh. 2016.

УДК 613.2.03

## ФАЗНОЕ ПИТАНИЕ – НОВЫЙ ПРИНЦИП ПИТАНИЯ ЧЕЛОВЕКА

**Мухамеджанов Э.К., Ерджанова С.С., Белявская Д.И.**

Казахский Национальный Медицинский Университет им. С.Д. Асфендиярова,  
Алматы, Казахстан  
050000, Алматы, ул. Гоголя 96/98 кв.15 e-mail: labpharma@mail.ru

Разбирается модель фазного питания, когда необходимо отдельно использовать пищевые соединения для абсорбтивного и постабсорбтивного периодов. Такой подход позволит разрабатывать принципы питания для заболеваний связанных с нарушением энергетического гомеостаза (диабет, ожирение, сердечно-сосудистые расстройства). Исходя из такого положения, был разработан специализированный продукт для питания больных с ожирением.

**Ключевые слова:** принципы питания, постабсорбтивный период, специализированные продукты.

Питание основа жизнедеятельности, но в последние годы оно выступает главной причиной заболеваемости и смертности человека. Видимо в науке о питании мы упускаем очень важные аспекты. Все теории сбалансированного питания направлены на решение вопросов безопасности и адекватности питания. Питание в первую очередь направлено на обеспечение процессов ремонта и обновления белковых и клеточных структур и запасание избыточного потока энергии. Это осуществляется за счет секреции гормона инсулина и активации парасимпатического звена нервной системы. Однако это приводит к потере работоспособности – «сытое животное не охотник».

Когда же мы работает, то используем энергетические запасы организма. Это так называемое эндогенное питание. В настоящее время значительно изменился стиль жизни человека. Отмечается снижение физического труда и преобладание интеллектуальных и операторских видов деятельности, что привело к снижению потребления жиров и увеличению использования глюкозы. Это привело к развитию дефицита одного источника энергии (глюкозы), на фоне избытка другого – жиров. Развился энергетический дисбаланс способствующих увеличению метаболических патологий – диабета, ожирений и сердечно-сосудистых заболеваний. Необходимо способствовать коррекции энергетического дисбаланса, посредством использования специализированных продуктов в фазу работы или в постабсорбтивный период. Исходя из таких принципов, нами разработан специализированный продукт для питания больных ожирением, на который получен английский патент GB 2496119 от 22.01.2014. На этот продукт не происходит секреция инсулина, т.е. сохраняется работоспособность, он улучшает гомеостаз глюкозы при редукции рациона питания и предотвращает развитие функциональных нарушений, которые сопровождает обычные технологии по снижению массы тела.

Таким образом, в раздел науки о питании вносится представление о питании в постабсорбтивный период или использование пищевых соединений для поддержания гомеостаза глюкозы.

UDC 613.2.03

## PHASE NUTRITION – NEW MODEL NUYRITION OF HUMANS

**Mukhamejanov E.K., Erjanova S.S., Belyavskaya D.I.**

*Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarova,  
Almaty, Kazakhstan  
050000, Almaty, Gogol Str. 96/98 apt.15, e-mail: labpharma@mail.ru*

The model of phase nutrition is analyzed when it is necessary to use food compounds separately for the absorbent and post-absorbent periods. This approach will allow to develop the principles of nutrition for diseases associated with a violation of energy homeostasis (diabetes, obesity, cardiovascular disorders). Proceeding from this situation, a specialized product was developed to feed patients with obesity.

**Key words:** principles of nutrition, postabsorptive period, specialized products.

Nutrition is the basis of life activity, but in recent years it has been the main cause of morbidity and mortality in humans. Apparently we are missing very important aspects in the science of nutrition. All the theories of balanced nutrition are aimed at solving issues of the nutrition safety and adequacy. Nutrition is primarily aimed at ensuring the repair and renewal of protein and cellular structures and the storage of excess energy flow. This process occurs due to the secretion of the insulin hormone and the activation of the parasympathetic nervous system. However, this leads to a loss of efficiency - "well-fed animal is not a hunter".

When we work, we use the energy reserves of the body. This is the so-called endogenous nutrition. Nowadays the life style of a person has changed significantly. There is a decline in physical labor and a predominance of intellectual and operator activities, which led to a reduction in fat consumption and increased use of glucose. This led to the development of a deficit of the one energy source (glucose), against an excess of the other – fats. An energy imbalance has been developed that contributes to the increase in metabolic pathologies - diabetes, obesity and cardiovascular diseases. It is necessary to contribute to the correction of energy imbalance, through the use of specialized products in the phase of work or in the post-absorbent period. Based on such principles, we have developed a specialized product for feeding obese patients, to which English patent GB 2496119 of January 22, 2014 was received. This product does not induce the secretion of insulin, so working capacity remains, it improves the glucose homeostasis in reduced diet and prevents the development of functional disorders that accompany the usual technology directed to body weight reduction.

Thus, the idea of nutrition in the post-absorptive period or the use of food compounds to maintain glucose homeostasis is being introduced in the section of nutrition science.

УДК 664.2:557.15

## ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АТАКУЕМОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ КРАХМАЛА В КЛЕЙСТЕРИЗОВАННОМ СОСТОЯНИИ

**Папахин А.А., Бородина З.М.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр 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.*

В результате проведенных исследований установлено, что испытуемые образцы нативных и модифицированных крахмалов различных видов в клейстеризованном состоянии проявляют аналогичную восприимчивость к действию амилолитических ферментов: альфа-амилазы, глюкоамилазы, пуллулазы. Ферментативная атакуемость всех образцов в заданных условиях составляла  $96,5 \pm 0,5$  %.

**Ключевые слова:** нативный крахмал, глюкозный эквивалент, разжижение, амилолитические ферменты, низкотемпературная биоконверсия, модификация крахмала.

Проводимые во ВНИИ крахмалопродуктов исследования по изучению действия амилолитических ферментов на нативный крахмал при различных температурных режимах в гетерогенной и гомогенной средах ориентированы на разработку новых отечественных конкурентоспособных биотехнологий перера-

ботки крахмала, обеспечивающих расширение ассортимента востребованных в РФ крахмалопродуктов и их импортозамещение. Целью данной работы было исследование ферментативной атакуемости различных видов крахмала: кукурузного нативного, модифицированного пористого кукурузного крахмала, ржаного, горохового, ячменного, овсяного, крахмала тритикале. Ферментативную атакуемость образцов модифицированных и нативных крахмалов различных видов определяли по методике, разработанной на основании скрининга методов определения атакуемости и резистентности крахмала и крахмалопродуктов, используемых в научных исследованиях в России и за рубежом. Схема определения соответствовала традиционной технологической схеме получения глюкозы из крахмала путем ферментативного гидролиза с использованием амилолитических ферментов: альфа-амилазы, глюкоамилазы и пуллулазы, включающей стадии приготовления суспензии, клейстеризации и разжижения (декстринизации крахмала) с применением термостабильной альфа-амилазы, осахаривания с применением глюкоамилазы и пуллулазы до достижения максимальной степени гидролиза. Ферментативную атакуемость испытуемых образцов крахмала оценивали по глюкозному эквиваленту – массовой доле редуцирующих сахаров в гидролизате, в % по СВ крахмала. В результате было установлено, что испытуемые виды крахмалов в клейстеризованном состоянии проявляют аналогичную восприимчивость к действию амилолитических ферментов. При этом ферментативная атакуемость всех образцов в заданных условиях составляла  $96,5 \pm 0,5\%$  в пересчете на сухое вещество крахмала. Оставшийся нерастворенным осадок крахмала представляет собой смесь нередуцирующих полисахаридов крахмала и его нерастворимых составляющих (белок, зола и т.д.).

УДК 664.2:557.15

## ENZYMATIC SENSITIVITY OF DIFFERENT TYPES OF STARCH IN THE GELATINIZED STATE

Papakhin A.A., Borodina Z.M.

All-Russian Research Institute for starch products - branch of V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences  
11 Nekrasova St., Kraskovo, Moscow region, 140051, Russia, vniik@arrisp.ru

As a result of the conducted researches it is established that tested samples of native and modified starches of different types in a gelatinized state show similar sensitivity to the action of amilolitic enzymes: alpha-amylase, glucoamylase, pullulanase. The enzymatic sensitivity of all samples in the set conditions is  $96,5 \pm 0,5\%$ .

**Key words:** native starch, glucose equivalent, dilution, amilolitic enzymes, low-temperature bioconversion, modification of starch properties.

The researches on studying the action of amilolitic enzymes on native starch at different temperatures in heterogeneous and homogeneous media which are conducted in the All-Russian Research Institute of Starch Products, are directed to the development of new domestic competitive biotechnologies of starch processing to provide expansion of the range of starch products demanded in the Russian Federation and their import substitution.

The purpose of this work was to the research enzymatic sensitivity of different types of starch such as corn native starch, modified porous corn starch and rye, pea, barley, oat, triticale starches. The enzymatic sensitivity of samples of the modified and native starches of different types was determined by the technique developed on the basis of the screening of definition methods for sensitivity and resistance of starch and starch products that are used for scientific research in Russia and abroad. The definition scheme corresponded to the traditional technological scheme of receiving glucose from starch by enzymatic hydrolysis with the use of amilolitic enzymes: alpha amylase, glucoamylase and pullulanase and with including the following stages: preparation of suspension, a gelatinization and dilution (a starch dextrinization) with the use of thermostable alpha-amylase, an saccharification with use of glucoamylase and pullulanase to achieve of the maximum degree of hydrolysis. The enzymatic sensitivity of the tested starch samples was estimated by a glucosic equivalent – a mass portion of reducing sugars in a hydrolyzate, as % by starch DS. As a result it has been established, that the tested gelatinized starch types show similar sensitivity to the action of amilolitic enzymes. At the same time the enzymatic sensitivity of all samples in the set conditions was  $96,5 \pm 0,5\%$  by starch dry solids. The remained not dissolved precipitation of starch represents mix of not reducing polysaccharides of starch and its insoluble components (protein, ashes, etc.).

УДК 577.15:636.087

## ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ ОСНОВНЫХ АНТИПИТАТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ СОИ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ КОРМОВЫХ ДОБАВОК

Костылева Е.В.<sup>1</sup>, Середя А.С.<sup>1</sup>, Великорецкая И.А.<sup>1</sup>, Шариков А.Ю.<sup>1</sup>, Цурикова Н.В.<sup>1</sup>, Скороход В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – 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](mailto:ekostyleva@list.ru)

<sup>2</sup> ООО Концерн «Микробиопром», Москва, Россия, 125009, пер. Газетный, д.9, к.2

Разработана технология получения на основе соевого шрота белковых кормовых добавок, не содержащих антипитательных факторов, для поросят-отъемышей и аквакультуры. Технология предусматривает использование отечественных ферментных препаратов, подобранных с учетом биохимического состава соевого шрота и требований к качеству конечных продуктов.

**Ключевые слова:** соевый шрот, белковые кормовые добавки, отечественные ферментные препараты

Один из перспективных способов решения проблемы дефицита пищевого и кормового белка заключается в повышении питательной ценности растительного белоксодержащего сырья за счет устранения антипитательных факторов.

Для производства белковых кормовых добавок широко используется вторичный продукт производства соевого масла – соевый шрот (СШ), который по содержанию белка и его аминокислотному составу не уступает некоторым источникам кормового белка животного происхождения. В то же время соя содержит большое количество антипитательных факторов, что существенно ограничивает области ее применения в кормопроизводстве [1, 2]. С учетом особенностей ЖКТ, наиболее высокие требования предъявляются к кормовым добавкам для поросят-отъемышей и аквакультуры. Для молочных поросят, у которых еще не сформирована ферментативная система в кишечнике, необходимо полное устранение антипитательного действия основных белков и галактоолигосахаридов (ГОС) сои. Для аквакультуры, помимо этого, требуется максимальное удаление углеводной фракции [2, 3].

Исходя из компонентного состава СШ и требований к конечным продуктам, нами были разработаны технологии получения двух видов белковых кормовых добавок, не обладающих антипитательными свойствами: продукта с содержанием сырого протеина 50 – 56% а.с.в. для рационов поросят-отъемышей и продукта с содержанием 90 – 92% а.с.в. – для аквакультуры.

Важным аспектом разработанной технологии является выбор ферментных препаратов (ФП) с необходимой специфичностью действия.

Сравнение эффективности кислых аспартатных, бактериальных нейтральных и сериновых протеаз при обработке СШ показало, что наиболее интенсивно антипитательные белки сои гидролизуют сериновые протеазы. Высокую эффективность по отношению к трудногидролизуемым антипитательным белкам СШ проявил отечественный ФП бактериальной сериновой протеазы Протозим В, который обеспечил гидролиз всех белков СШ до пептидов с молекулярной массой ниже 15 кДа, не обладающих антипитательным действием.

Наибольшую эффективность по отношению к основным антипитательным углеводам сои – стахиозе и раффинозе, проявил препарат Альфа-Галактозидаза С, который предпочтительно гидролизует α-галактозидные связи в низкомолекулярных ГОС.

Технология получения кормовых добавок для аквакультуры включает этап ферментативной обработки высокомолекулярных углеводов сои с образованием водорастворимых сахаров. Основные полимерные углеводы сои представлены пектиновыми веществами (до 17%) и целлюлозой (до 8%), поэтому для их гидролиза требуются ФП с высоким уровнем активности пектиназ и целлюлаз. Из представленных на рынке кормовых комплексных ФП, предназначенных для гидролиза некрахмальных полисахаридов растительного сырья, оптимальным соотношением ферментов для интенсивного расщепления высокомолекулярных углеводов СШ обладает отечественный препарат Пектофоетидин, содержащий пектиназу и целлюлазу в качестве основных действующих ферментов.

Разработанные во ВНИИПБТ методы устранения антипитательных свойств соевых белков и углеводов, включающие комбинирование экструзионной и ферментативной обработки соевого шрота, расширя-

ют спектр получаемых на основе сои кормовых продуктов с повышенной питательной ценностью. Применение отечественных ФП позволяет удешевить технологию и осуществить импортозамещение.

Литература:

1. Fischer M. *Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein*. Ph.D. Thesis. Wageningen University, The Netherlands, 2006.
2. C. C. Chen, Y. C. Shih, P. W. S. Chiou, B. Yu. *Evaluating Nutritional Quality of Single Stage- and Two Stage-fermented Soybean Meal*. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2010;23(5):598-606.
3. Barnes, M., Brown, M., Rosentrater, K. and Sewell, J. *An initial investigation replacing fish meal with a commercial fermented soybean meal product in the diets of juvenile rainbow trout*. *Open Journal of Animal Sciences*, 2012. 2, p. 234-243.

UDC 577.15:636.087

## ENZYME PREPARATIONS PROVIDING DESTRUCTION OF THE MAIN SOYBEAN ANTI-NUTRITIONAL FACTORS FOR OBTAINING PROTEIN FEED ADDITIVES

Kostyleva E.V.<sup>1</sup>, Sereda A.S.<sup>1</sup>, Velikoretskaya I.A.<sup>1</sup>, Sharikov A.Yu.<sup>1</sup>, Tsurikova N.V.<sup>1</sup>, Skorokhod V.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – a branch of the Federal State Budget Institution of Science, Federal Research Centre of food, biotechnology, and food safety, Samokatnaya str., 4b, Moscow, 111033, Russia  
e-mail: ekostyleva@list.ru

<sup>2</sup> Association Microbioprom, Gazetny ally, 9, Bldg. 2, Moscow, 125009, Russia

A technology has been developed for producing protein feed additives based on soybean meal containing no anti-nutritional factors, for weaned piglets and aquaculture. The technology involves the use of domestic enzyme preparations selected according to the biochemical composition of soybean meal and the requirements for the final products quality.

**Key words:** soybean meal, protein feed additives, domestic enzyme preparations

One of the promising ways to solve the problem of food and feed protein deficiency is to increase the nutritional value of vegetable protein sources by eliminating anti-nutritional factors.

For the production of protein feed additives, the secondary product of soybean oil production – soybean meal (SBM) is widely used, which, in terms of protein content and its amino acid composition, is close to some animal sources of protein. At the same time, soy contains a large amount of anti-nutritional factors, which significantly limits the area of its application in feed production [1, 2]. Taking into account the characteristics of the gastrointestinal tract, the highest requirements are imposed on feed additives for weaned piglets and aquaculture. For piglets, which have not yet formed the enzymatic system in the intestine, is necessary to completely eliminate the anti-nutritional action of soy proteins and galactooligosaccharides (GOS). For aquaculture, in addition, the maximum removal of carbohydrate fraction is required [2, 3].

Based on the SBM component composition and the requirements for final products quality, we have developed technologies for obtaining two types of protein feed additives possessing no anti-nutritional properties: a product with a crude protein content of 50-56% on the absolutely dry matter (a.d.m.) for rations of weaned piglets and a product with a content of 90 - 92% a.d.m. – for aquaculture.

An important aspect of the developed technology is the choice of enzyme preparations (EP) with the required specificity.

Comparison of the effectiveness of acidic aspartate, bacterial neutral, and serine proteases in the process of SBM treatment has shown that serine proteases most intensively hydrolyzed soybean anti-nutritional proteins. The domestic EP of bacterial serine protease Protozim B was highly effective in degrading of hardly hydrolysable SBM proteins providing the hydrolysis of all SBM proteins to peptides with a molecular weight below 15 kDa, which do not possess anti-nutritive properties.

Alpha-Galactosidase C preparation, which preferably hydrolyzes  $\alpha$ -galactoside bonds in low-molecular-weight GOS, showed the highest efficiency with respect to the main soybean anti-nutritive carbohydrates – stachyose and raffinose.

The technology of obtaining feed additives for aquaculture includes the stage of enzymatic conversion of high-molecular soy carbohydrates to water-soluble sugars for subsequent removal. The main polymeric carbohydrates of soybeans are pectin substances (up to 17%) and cellulose (up to 8%), therefore, for their hydrolysis, EP with a high

level of pectinase and cellulase activity is required. Of the commercial complex EPs on the feed market intended for the hydrolysis of non-starch polysaccharides, the domestic preparation Pectofectidine possesses the optimal ratio of enzymes for the intensive cleavage of high molecular weight carbohydrates in SBM. This EP contains pectinase and cellulase as the key enzymes of the complex.

The methods developed for eliminating the anti-nutritional properties of soy proteins and carbohydrates, including combining extrusion and enzymatic processing of soybean meal, expand the range of soybean feed products with increased nutritional value. The use of domestic EPs makes it possible to reduce the technology cost and carry out import substitution.

*References:*

1. Fischer M. *Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein. Ph.D. Thesis. Wageningen University, The Netherlands, 2006.*
2. C. C. Chen, Y. C. Shih, P. W. S. Chiou, B. Yu. *Evaluating Nutritional Quality of Single Stage- and Two Stage-fermented Soybean Meal. Asian-Australas J Anim Sci. 2010;23(5):598-606.*
3. Barnes, M., Brown, M., Rosentrater, K. and Sewell, J. *An initial investigation replacing fish meal with a commercial fermented soybean meal product in the diets of juvenile rainbow trout. Open Journal of Animal Sciences, 2012. 2, p. 234-243.*

УДК 637.4.04

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ НА ОСНОВЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

**Стефанова И.Л., Мазо В.К., Кавтарашвили А.Ш., Клименкова А.Ю., Шахназарова Л.В.**

*«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*

Разработана комплексная технология получения функциональных продуктов из белка или меланжа, предусматривающая обогащение функциональными пищевыми ингредиентами на всех этапах технологического процесса.

**Ключевые слова:** функциональные пищевые продукты, биофортификация, яйцепродукты, обогащение

Практическая реализация принципов оздоровительного питания предполагает разработку и рост производства функциональных пищевых продуктов (ФПП) с эффективностью, отвечающей критериям доказательной медицины и для которых, во-первых, необходимо использование пищевого сырья высокой биологической и пищевой ценности, и во-вторых, применение современных технологий, обеспечивающих сохранность и биодоступность функциональных пищевых ингредиентов (ФПИ) в составе продукта.

Перспективным и даже уникальным пищевым сырьем для производства ФПП и ФПИ являются яйца домашней птицы, поскольку они содержат в своем составе все необходимые для развития эмбриона пищевые и биологически активные вещества.

Разрабатываемая технология предусматривает обогащение яиц ФПИ на всех этапах технологического процесса производства ФПП.

Развиваемая в настоящее время на промышленной основе биофортификация (обогащение состава яйца путем добавления в корм определенных эссенциальных нутриентов), способна повышать пищевую и биологическую ценность яйца, повышая содержание в яйцах витаминов, минеральных веществ и полиненасыщенных жирных кислот.

Биофортификационный подход предусматривает обогащение яиц омега-3 жирными кислотами, селеном и витамином Е за счет введения в кормовой рацион дополнительно «Сел-Плекс», «Селинит натрия», льняного масла и жмыха семени льна, препарата «Жирные кислоты», в результате чего полученные функциональные яйца отличает отношение  $\omega$ -66: $\omega$ -63 2,3-2,9:1, содержание селена в 2,2-2,3 раза, а витамина Е в 2,0-2,8 раза выше, чем при традиционном откорме.

Биофортификационный подход эффективно дополнен обогащением яиц кальцием и йодом, за счет обогащения белка или меланжа в процессе кислотно-солевого гидролиза, проводимого при нагреве.

В качестве источника кальция использовали минеральный обогатитель из скорлупы куриных яиц, источника йода – порошок из морской капусты «Ламинар».

Содержание кальция в коагулированном белке при введении минерального обогатителя в количестве 1% от массы белка составило 470,9-439,0 мг/100 г. Содержание йода в коагулированном белке составило 311-281 мкг/100 г при введении 0,2% «Ламинар» или 456 мкг на 100 белка.

Содержание кальция и йода при обогащении меланжа составило 399,4-386,2 мг/100 г и 0,258-0,273 мкг/100 г соответственно.

Яичный белок связывает большее количество кальция и йода по сравнению с меланжем, несмотря на большее отделение сыворотки в белке, содержащей в своем составе кальций и йод, что объясняется связыванием этих ФПИ за счет белка, содержание которого в меланже ниже по сравнению с яичным белком.

На этапе получения рецептуры продукта производят обогащение органической формой цинка при смешивании коагулированного яичного белка или меланжа с наполнителями, содержание цинка в конечном продукте составляет 2,2-3,2 мкг/100 г.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-16-04047).

UDC 637.4.04

## FUNCTIONAL EGG BASED FOODSTUFFS

**Stefanova I.L., Mazo V.K., Kavtarashvili A. Sh., Klimenkova A.Yu., Shahnazarova L.V.**

*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 Province, Russia  
141552 Moscow Province, Solnechnogorsk district, township Rzhavki, Building 1  
e-mail: dp.vniipp@mail.ru*

The multistage technology was developed for the production of functional foodstuffs based on the albumen or melange of chicken eggs. The technology involves enrichment of the products with different functional ingredients at all the stages of the production.

**Key words:** functional foodstuffs, biofortification, egg products, enrichment.

The practice of the therapeutic nutrition requires development and expansion of the existing range of functional foodstuffs (FFs) with evidential therapeutic effects. On the one hand, production of the FFs requires raw materials of high biological and nutritive value; on the other hand, modern technologies are required providing preservation and bioavailability of functional food ingredients (FFIs) within the products.

Poultry eggs are the prospective and even unique raw material for the production of FFs and FFIs since the eggs contain all the nutrients and bioactive substances necessary for the embryonic development.

Modern techniques of commercial production of biofortified eggs (i.e. enriched with certain essential nutrients via the diets for laying hens) can improve nutritive and biological value of the eggs including the increases in the contents of vitamins, minerals, polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

Our technology involves enrichment of the products with FFIs at all the stages of the production of FFs.

Preliminary biofortification of eggs with  $\omega$ -3 PUFAs, selenium, and vitamin E via additional supplementation of the diets for laying hens with "Sel-Plex"©, sodium selenite, flaxseed oil and cake, preparation "Fatty Acids" was developed. Ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 PUFAs in the fortified eggs was 2.3-2.9:1; contents of selenium was 2.2-2.3 times higher and vitamin E 2.0-2.8 times higher in compare to eggs from layers fed the conventional diets.

This biofortification was effectively complemented with the enrichment of albumen or melange from the biofortified eggs with calcium and iodine at the stage of acid-salt hydrolysis and thermal treatment.

The source of calcium was an eggshell based mineral concentrate; the source of iodine was dried laminaria powder ("Laminar").

At the dose of mineral concentrate 1% calcium content in the coagulated albumen was 470.9-439.0 mg/100 g. At the dose of "Laminar" 0.2% (or 456 mg of iodine per 100 g of the albumen) iodine content in the coagulated albumen was 311-281 mg/100 g.

The contents of calcium and iodine in enriched coagulated melange was 399.4-386.2 mg/100 g and 0.258-0.273  $\mu$ g/100 g, respectively.

The albumen binds more calcium and iodine in compare to the melange despite the greater serum yield; this difference is due to the greater protein content in the albumen since this elements are binding primarily by proteins.

At the stage of the mixing of coagulated egg products with fillers the enrichment with an organic form of zinc



was performed; the resulting zinc content in the final products was 2.2-3.2 µg/100 g.

The study was financed by Russian Science Foundation, grant 16-16-04047.

УДК 637.4.04

## ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ НА ОСНОВЕ КУРИНОГО ЯИЧНОГО БЕЛКА ИЛИ МЕЛАНЖА ОБОГАЩЕННЫЙ ЙОДОМ

**Стефанова И.Л., Мокшанцева И.В., Шахназарова Л.В., Клименкова А.Ю., Мазо В.К.**

*«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 высокой биологической и пищевой ценности. Установлены способ и уровень введения функционального ингредиента, обеспечивающий содержание йода в продукте не менее 20% нормы суточного потребления и его высокую биодоступность и сохранность.

**Ключевые слова:** функциональные пищевые продукты, биофортификация, яйцепродукты, обогащение

В основу производства функциональных продуктов из белка и меланжа, готовых к употреблению, положена технология получения зерненных коагулированных белка и меланжа основанная на кислотно-соловом гидролизе в процессе тепловой обработки сырья.

Обогащение йодом яичного белка и меланжа осуществлялось в процессе их коагуляции введением сухого порошка из морской капусты.

Содержание йода было выше в коагулированном белке, чем в меланже при одинаковом уровне внесения водорослей. Установлено, что при повышении конечной температуры коагуляции выход обогащенного коагулированного продукта повышается. Содержание йода в коагулированном белке также несколько повышается при повышении конечной температуры коагуляции, в то время как в коагулированном меланже содержание йода не зависит от конечной температуры коагуляции. Установлено также, что потери йода при коагуляции подкисленных яйцепродуктов незначительны.

При введении порошка морской капусты «Ламинар», массовая доля йода в котором составила 189 мг/100 г, содержание йода в продукте составило 1,43; 2,11 и 2,22 мг/100 г соответственно при внесении 1,0; 1,5 и 2,0 % порошка. Полученные данные свидетельствовали о целесообразности введения порошка морской капусты в количестве не более 0,5 % к массе яичного белка или меланжа.

Содержание йода в коагулированном белке незначительно увеличивается при повышении конечной температуры коагуляции от 86 до 90 °С и составляет 0,98; 1,06; 1,03 мг/100г продукта при температуре 86; 88; 90 °С соответственно. При этом выход коагулированного продукта увеличивается от 70,5 до 79,0 %.

Содержание йода в коагулированном меланже при температуре 88; 90; 92°С составляет 1,04; 1,01; 1,03 мг/100 г продукта соответственно, при этом выход коагулированного обогащенного меланжа снижается по мере повышения температур и составляет 95,8; 92,3; 89,9 % соответственно.

Состав разработанных продуктов приведен в таблице 1.

Таблица 1. – Состав коагулированного яичного белка и меланжа, обогащенных йодом

Наименование параметра	Коагулированный яичный белок	Коагулированный яичный меланж
Массовая доля влаги, %	82,8±0,19	70,7±0,20
Массовая доля белка, %	14,3±0,12	14,5±0,14
Массовая доля жира, %	-	12,2±0,05
Содержание йода, мг/100г	1,05±0,04	1,02±0,05

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-16-04047).

UDC 637.4.04

## FUNCTIONAL IODINE-ENRICHED FOODSTUFFS BASED ON THE ALBUMEN OR MELANGE OF CHICKEN EGGS

Stefanova I.L., Mokshantseva I.V., Shahnazarova L.V., Klimenkova A.Yu., Mazo V.K.

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 Province, Russia  
141552 Moscow Province, Solnechnogorsk district, township Rzhavki, Building 1  
e-mail: dp.vniipp@mail.ru

New egg-derived functional foodstuffs with high biological and nutritive value are presented. The method and level of inclusion of functional ingredient were developed providing iodine content in the resulting products no less than 20% of the required daily consumption and high bioavailability and stability of iodine.

**Key words:** functional foodstuffs, biofortification, egg products, enrichment

The production of consumer-ready functional foodstuffs based on egg albumen and melange was developed involving production of coagulated grained albumen or melange using acid-salt hydrolysis during the thermal treatment of the respective raw products.

The albumen and melange were enriched with iodine during the coagulation via supplementation with dried laminaria powder.

Iodine content in coagulated albumen was higher in compare to melange at the same level of supplementation with laminaria. It was found that the increase in final coagulation temperature improves the yield of the coagulated product. Iodine content in coagulated albumen slightly increases with the increase in coagulation temperature while iodine content in coagulated melange was not influenced by the temperature. Iodine losses from acidified egg products were found to be negligible.

Supplementation of the products with laminaria powder "Laminar" (iodine content 189 g/100 g) resulted in iodine contents in the final products 1.43; 2.11 and 2.22 mg/100 g respective to supplementation levels 1.0; 1.5 and 2.0%. The optimal dose of the laminaria as a supplement for egg albumen or melange was found to be no more than 0.5% (by weight).

Iodine content in coagulated albumen slightly increases with the increase in final coagulation temperature: 0.98; 1.06 and 1.03 mg/100g at temperatures 86; 88 and 90°C, respectively, with the accompanying increase in coagulation yield from 70.5% at 86°C to 79.0% at 90°C.

Iodine content in coagulated melange was 1.04; 1.01 and 1.03 mg/100g at coagulation temperatures 88; 90 and 92°C, respectively, while the respective coagulation yields tended to decrease with the increase in temperature (95.8; 92.3 and 89.9%).

The basic parameters of chemical composition of the developed products are presented in Table 1.

Table 1. – The composition of iodine-enriched egg albumen and melange

Parameter	Coagulated albumen	Coagulated melange
Moisture content, %	82.8±0.19	70.7±0.20
Protein content, %	14.3±0.12	14.5±0.14
Fat content, %	-	12.2±0.05
Iodine content, mg/100 g	1.05±0.04	1.02±0.05

The study was financed by Russian Science Foundation, grant 16-16-04047.

УДК 636.52/.58.084.524

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО ОБОГАЩЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ЯИЦ ПНЖК $\Omega$ -3, СЕЛЕНОМ И ВИТАМИНОМ Е

Кавтарашвили А.Ш., Стефанова И.Л., Свиткин В.С., Новоторов Е.Н.

*«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*

В опытных группах при лучших показателях продуктивности и конверсии корма содержание в 100 г съедобной части яйца  $\omega$ -3 ПНЖК было в 3,4–5,0 раз, селена – в 2,2–2,3 раза, витамина Е – в 2,0–2,8 раза выше по сравнению с контролем. Лучшие результаты достигнуты в группе, где источником селена были «Сел-Плекс» и «Селенит натрия» 1:1, а источником витамина Е – «Жирные кислоты».

**Ключевые слова:** куры, продуктивность, конверсии корма, обогащенные яйца, ПНЖК  $\omega$ -3, селен, витамин Е.

В виварии СГЦ «Загорское ЭПХ» на курах промышленного стада кросса «СП-789» в клеточных батареях со 140- до 200-дневного возраста птицы (7 групп по 30 голов в каждой группе) изучали эффективность комплексного обогащения пищевых яиц полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК)  $\omega$ -3, неорганическими и органическими формами селена и витамина Е.

В контрольной группе 1 использовали стандартный пшеничный рацион (ОР), состоящий из 57,2% пшеницы, 5,47% отрубей, 10,36% соевого шрота, 8,56% подсолнечного жмыха, 3% кукурузного глютена, 4% подсолнечного масла. Содержание  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 ПНЖК составило 3,69 и 0,12% соответственно, а их соотношение 30,8:1; содержание витамина Е – 10 г, чистого элемента селена, источником которого являлся «Селенит натрия» – 0,2 г /т корма. В рационах опытных групп 2–4 в ОР была осуществлена замена 3% подсолнечного масла на льняное масло и введено 5% жмыха семени льна. Содержание  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 ПНЖК составило 2,49 и 2,16% соответственно, а их соотношение 1,15:1; содержание витамина Е – 150 г, чистого элемента селена – 0,5 г/т корма. В рационах опытных групп 5–7 в ОР подсолнечное масло полностью заменили льняным маслом (3%) и препаратом «Жирные кислоты» (1,5%) и ввели 5% жмыха семени льна. Содержание  $\omega$ -6 и  $\omega$ -3 ПНЖК составило 2,50 и 2,23% соответственно, а их соотношение 1,12:1; содержание витамина Е – 150 г, а чистого элемента селена – 0,5 г/т корма. В рационах 1–4 групп источником витамина Е была синтетическая форма (DL-альфа-токоферол), а 5–7 групп – органическая форма (D-альфа-токоферол в препарате «Жирные кислоты»). Источником селена в группах 2 и 5 являлся «Сел-Плекс», группах 3 и 6 – «Сел-Плекс» и «Дафс-25» 1:1, группах 4 и 6 – «Сел-Плекс» и «Селенит натрия» 1:1. Во всех рационах вводили ферментный препарат «Феркорд» в дозе 100 г/т корма.

Установлено, что опытные группы 2–7 превосходили контроль по яйценоскости кур (48,6–51,2 шт.) на 4,5–10,1%, выходу яичной массы на несушку (2,691–2,893 кг) – на 5,3–13,2%, массе яиц (55,5–56,5 г) – на 1,1–2,9%, конверсии корма в яичную массу (2,36–2,50 кг) – на 4,6–9,9%; по содержанию в 100 г съедобной части яйца селена (59,3–61,5 мкг) в 2,2–2,3 раза, витамина Е (6,16–8,82 мг) – в 2,0–2,8 раза,  $\omega$ -3 ПНЖК (655–960 мг) – в 3,4–5,0 раз (при соотношении  $\omega$ -6 к  $\omega$ -3 – 2,3–2,9:1 против 14,2:1 в контроле), в т.ч. содержание альфа-линоленовой кислоты (400–618 мг) – в 5,2–8,0 раз, эйкозапентаеновой кислоты (15–26 мг) – в 1,4–2,4 раза, докозапентаеновой (26–55 мг) – в 1,5–3,2 раза, докозагексаеновой кислоты (202–330 мг) – в 2,3–3,8 раза. Среди опытных групп лучшие результаты при введении в рацион кур-несушек синтетического источника витамина Е зарегистрированы в группе 4, а при введении органического источника – в группе 7 при превосходстве последней над первой.

Таким образом, результаты исследования показали высокую эффективность комплексного обогащения пищевых яиц кур  $\omega$ -3 ПНЖК, различными формами селена и витамина Е. Лучшие результаты были достигнуты в опытной группе 7, где источником селена являлись «Сел-Плекс» и «Селенит натрия» 1:1, а источником витамина Е – препарат «Жирные кислоты».

Исследование финансировалось российским научным Фондом, Грант № 16-16-04047.

UDC 636.52/.58.084.524

## THE EFFICIENCY OF BIOFORTIFICATION OF TABLE EGGS WITH $\omega$ -3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS, SELENIUM, AND VITAMIN E

Kavtarashvili A.Sh., Stefanova I.L., Svitkin V.S., Novotorov E.N.

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 Province, Russia  
141552 Moscow Province, Solnechnogorsk district, township Rzhavki, Building 1  
e-mail: dp.vniipp@mail.ru

Experimental groups had better egg productivity and feed conversion ration in compared to control; content of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids in eggs (per 100 g of edible part of the eggs) was 3.4-5.0 times higher in compare to control, selenium 2.2-2.3 times, vitamin E 2.0-2.8 times. The best results were found in the group fed a mixture of Sel-Plex® plus sodium selenite (1:1) as selenium source, and preparation "Fatty Acids" as vitamin E source.

**Key words:** laying hens, egg production, feed conversion ratio, biofortified eggs,  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids, selenium, vitamin E.

The efficiency of complex biofortification of table chicken eggs with  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), organic and inorganic forms of selenium (Se) and vitamin E (VE) was studied in a trial on commercial "SP-789" layers (White Leghorn) kept in cage batteries in the Institute's vivarium from 140 to 200 days of age (7 groups, 30 birds per group).

Control group 1 was fed standard commercial wheat-based diet (basic diet BD) containing wheat 57.2%, wheat bran 4.7%, soybean meal 10.36%, sunflower cake 8.56%, corn gluten 3%, sunflower oil 3%. The dietary contents of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 PUFAs were 3.69 and 0.12%, respectively,  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio 30.8:1; VE content 10 ppm, Se 0.2 ppm (as sodium selenite). Groups 2-4 were fed BD with the substitution of flaxseed oil for the sunflower oil (3%) and supplemented with flaxseed cake (5%). The contents of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 PUFAs were 2.49 and 2.16%, respectively,  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio 1.15:1; VE content 150 ppm, Se 0.5 ppm. Groups 5-7 were fed the same diet as groups 2-4 supplemented with "Fatty Acids" preparation (1.5%). The contents of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 PUFAs were 2.50 and 2.23%, respectively,  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio 1.12:1; VE content 150 ppm, Se 0.5 ppm. In groups 1-4 VE source was synthetic DL-alpha-tocopherol, in groups 5-7 preparation "Fatty Acids" (an organic form of VE). Se source in group 2 and 5 was Sel-Plex®, in groups 3 and 6 Sel-Plex® + "DAFS-25" (1:1), in groups 4 and 6 Sel-Plex® + sodium selenite (1:1). All diets were supplemented with enzyme preparation "Fecord" (100 ppm).

Egg production during 60 days of the trial in experimental groups (48.6-51.2 eggs per hen) was 4.5-10.1% higher in compare to control; egg mass output (2.691- 2.893 kg per hen) higher by 5.3-13.2%; egg weight (55.5-56.5 g) higher by 1.1-2.9%; feed conversion ratio (2.36-2.50 kg per 1 kg of egg mass laid) lower by 4.6-9.9%. Se content in 100 g of edible part of the eggs (59.3- 61.5  $\mu$ g) was 2.2-2.5 times higher in compare to control; VE content (6.16-8.82 mg) 2.0-2.8 times higher; total content of  $\omega$ -3 PUFAs (655-960 mg) 3.4-5.0 times higher (with  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio 2.3-2.9:1 vs. 14.2:1 in control);  $\alpha$ -linoleic acid (400-618 mg) 5.2-8.0 times higher; eicosapentaenoic acid (15-26 mg) 1.4-2.4 times higher; docosapentaenoic acid (26-55 mg) 1.5-3.2 times higher; docosahexaenoic acid (202-330 mg) 2.3-3.8 times higher in compare to control. The best results with synthetic VE were found in group 4 and with organic VE in group 7, the latter being better than the former.

It was concluded the supplements studied can effectively biofortify table eggs with  $\omega$ -3 PUFAs, SE and VE. The best results were found in the group fed a mixture of Sel-Plex® plus sodium selenite (1:1) as selenium source, and preparation "Fatty Acids" as vitamin E source.

The study was financed by Russian Science Foundation, grant 16-16-04047.

УДК 664+663: 66.081.6

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ ИНГРЕДИЕНТОВ ДЛЯ ЗДОРОВЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Кудряшов В.Л., Погоржельская Н.С., Фурсова Н. А., Алексеев В.В.

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, 4б  
e-mail: vera\_vikir@mail.ru

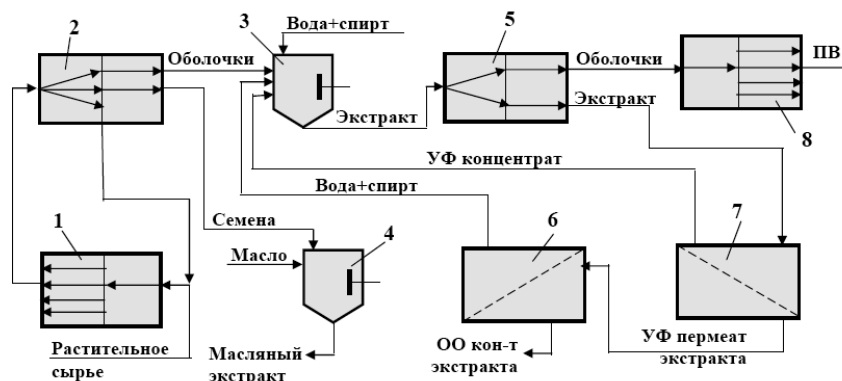
Показана роль и эффективность мембранных процессов при производстве ингредиентов из различного сырья и продуктов микробиосинтеза для производства здоровых продуктов питания с оптимальным составом БАВ

**Ключевые слова:** мембранные процессы, ультрафильтрация, нанофильтрация, обратный осмос, ингредиенты, микробиосинтез, биологически активные вещества

Масштабные НИР проведенные в ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» установили ряд нарушений в питании населения РФ: избыточное потребление животных жиров; дефицит полноценных белков, полиненасыщенных жирных кислот, пищевых волокон (ПВ), большинства витаминов - особенно С, В1, В2, А, Д, Е, фолиевой кислоты и каротиноидов. При этом количество и калорийность пищи, как правило, превышают потребности человека. Отсюда возникает причина из-за которой даже теоретически невозможно при рационе из обычных продуктов питания обеспечить его всеми необходимыми нутриентами и биологически активными веществами (БАВ) в достаточном и оптимальном соотношении.

Эта проблема решается введением биологически активных добавок (БАД) с повышенным содержанием того или иного нутриента или их комплекса [1].

Для решения этой проблемы необходимо организовать крупнотоннажное производство соответствующих БАВ путем их микробиосинтеза или/и выделения и концентрирования из растительного и животного сырья. Так как в этом сырье БАВы часто содержатся в разбавленном состоянии и содержат значительное количество нежелательных примесей, то необходимо создавать технологии по их выделению и концентрированию. Как показывает анализ и накопленный опыт – оптимальными процессами для этих целей являются мембранные (МП): микрофильтрация (МФ), ультрафильтрация (УФ), нанофильтрация (НФ) и обратный осмос (ОО). Так для производства витаминов и др. БАВ из растительного сырья (плодов, травяного сырья, корней и клубней) во ВНИИПБТ разработана универсальная технологическая линия представленная на рисунке (где: 1- измельчитель; 2 – рассеиватель; 3 и 4 – ультразвуковые экстракторы; 5 – шнековый пресс; 6 и 7- ОО - и УФ установки; 8-тонкий измельчитель) [2].



Технологии производства с применением МП и процессов микробиосинтеза других ингредиентов и БАВ (биоконсерванта низина, ферментализатов дрожжей, про- и пребиотиков, изолятов белков) подробно описаны в источниках [2 и 3].

Литература:

1. Тутельян В.А. Современные подходы к обеспечению качества и безопасности биологически активных добавок к пище в Российской Федерации // Тихоокеанский медицинский журнал. 2009. № 1. - С. 12 – 19.
2. Кудряшов В.Л. Основы, области применения, эффективность и перспективы использования баромембранных процессов при производстве ингредиентов, добавок и продуктов питания // Матер. конгр. НАН Беларуси « НАУКА, ПИТАНИЕ и ЭДОРОВЬЕ» (Минск, 8-9 июня 2017).. Мн.: Белорусская наука. 2017. - С. 302-310.
3. Курбатова Е.И. Исследование и разработка гибридного способа производства глубокоочищенных жидких и сухих гидролизатов дрожжей // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов. Сб. науч. тр. ВНИИПБТ. М.: ВНИИПБТ. 2016. - С. 180 - 189.

UDC 664+663: 66.081.6

## EFFICIENCY OF MEMBRANE PROCESSES IN THE PRODUCTION OF INGREDIENTS FOR HEALTHY FOODSTUFFS

Kudryashov V.L., Pogorzhelskaya N.S., Fursova N.A., Alekseev V.V.

All-Russian research Institute of food biotechnology is a branch of Federal state budget institution of science Federal research center of food, biotechnology and food safety, Moscow, Russia  
111033, Moscow, str. Samokatnaya, 4-B,  
e-mail: vera\_vikir@mail.ru

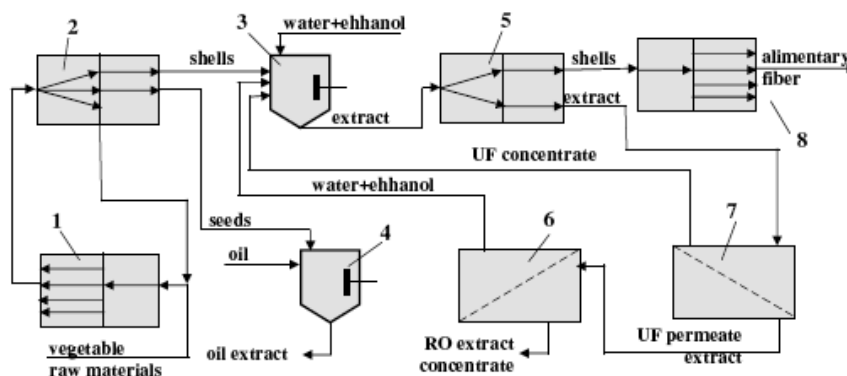
The role and efficiency of membrane processes in the production of ingredients from various raw materials and products of microbiose synthesis for the production of healthy food products with the optimal composition of BAS

**Key words:** membrane processes, ultrafiltration, nanofiltration, reverse osmosis, ingredients, microbiosynthesis, biologically active substances

Large-scale R & D conducted in FGBUN «FICs for nutrition and biotechnology» established a number of violations in the diet of the Russian Federation: excessive consumption of animal fats; deficiency of high-grade proteins, polyunsaturated fatty acids, dietary fiber (DV), most vitamins - especially C, B1, B2, A, D, E, folate and carotenoids. At the same time, the quantity and calorie content of food, as a rule, exceed the needs of a person. Hence, there is a reason why, even theoretically, it is impossible to provide it with all the necessary nutrients and biologically active substances (BAS) in a sufficient and optimal ratio with a diet of ordinary food products.

This problem is solved by the introduction of biologically active additives (BAA) with an increased content of a particular nutrient or complex thereof [1].

To solve this problem, it is necessary to organize large-scale production of the corresponding BAS by their microbiosynthesis and / or isolation and concentration from plant and animal raw materials. Since in this raw material BASs are often contained in a diluted state and contain a significant amount of undesirable impurities, it is necessary to create technologies for their isolation and concentration. Analysis and experience show that the optimal processes for this purpose are membrane (MP): microfiltration (MF), ultrafiltration (UF), nanofiltration (NF) and reverse osmosis (RO). So for the production of vitamins, etc. BAS from vegetable raw materials (fruits, herbal raw materials, roots and tubers) in VNIIPBT developed a universal technological line presented in the figure (where: 1 - shredder, 2 - diffuser, 3 and 4 - ultrasonic extractors, 5 - screw press, 6 and 7 - RO - and UF plants, 8 - fine shredder) [2].



Production technologies using MP and microbiosynthesis processes of other ingredients and BAS (bioconvant of nisin, fermentolysates of yeast, pro- and prebiotics, protein isolates) are described in detail in the sources [2 and 3].

References:

1. Tutelyan V.A. *Modern Approaches to Ensuring the Quality and Safety of Biologically Active Food Additives in the Russian Federation* // *Tikhookeansky Medical Journal*. 2009. № 1. - P. 12 - 19.
2. Kudryashov V.L. *Fundamentals, fields of application, efficiency and prospects for using baromembrane processes in the production of ingredients, additives and food products* // *Proceedings of the Congress of NAS of Belarus «SCIENCE, FOOD AND EDOROVIE» (Minsk, June 8-9, 2017)* .. Minsk: Belarusian science. 2017. - P. 302-310.
3. Kurbatova E.I. *Research and development of a hybrid method for the production of deeply purified liquid and dry yeast hydrolysates* // *Promising enzyme preparations and biotechnological processes in food and feed technologies* // *Collection of scientific works VNIIPBT. M. : VNIIPBT. 2016. - P. 180 - 189.*

УДК 663.15: 663.531

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОВОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ TRICHODERMA REESEI С УВЕЛИЧЕННОЙ КСИЛАЗНОЙ И ЭНДОГЛЮКАНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ПРИ ОСАХАРИВАНИИ РЖАНОГО СУСЛА

Костылева Е.В.<sup>1</sup>, Цурикова Н.В.<sup>1</sup>, Середа А.С.<sup>1</sup>, Великорецкая И.А.<sup>1</sup>, Айсина А.М.<sup>2</sup>, Михайличенко Е.А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – 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

<sup>2</sup> Московский государственный университет пищевых производств (МГУПП), 125080, г. Москва, Волоколамское ш., д. 11

<sup>3</sup> Московский политехнический университет, 107023, г. Москва, Большая Семеновская ул., д. 38

Исследована эффективность применения при осахаривании ржаного сусла ферментного препарата, полученного на основе нового мутантного штамма *Trichoderma reesei* с увеличенной активностью ксиланазы и эндоглюканызы. Установлено, что улучшенный состав препарата способствует увеличению выхода спирта, снижению вязкости сусла и содержания остаточных редуцирующих веществ в бражке.

**Ключевые слова:** ксиланаза, эндоглюканыза, *Trichoderma reesei*, ржаное сусло

В России спирт производится, главным образом, на основе зернового сырья, содержащего большое количество некрахмальных полисахаридов (НКП): ксиланы, β-глюканы, целлюлозу. НКП увеличивают вязкость водно-мучных суспензий, снижая эффективность технологического процесса. Применение ферментных препаратов (ФП) целлюлолитического и гемицеллюлолитического действия, гидролизующих НКП, существенно снижает вязкость замеса, повышает выход конечного продукта, обеспечивает более полное использование сырья, позволяет получать сусло с высокой концентрацией сухих веществ, что особенно актуально для внедрения ресурсосберегающих технологий производства спирта.

Во ВНИИПБТ с применением УФ-мутагенеза и селекции получен штамм *Trichoderma reesei* 28-У-12 с увеличенной активностью эндоглюканызы и ксиланазы на 30 и на 80%, соответственно, что повышает его эффективность при гидролизе основных НКП пшеницы и ржи. В лабораторных ферментерах наработана культуральная жидкость исходного и мутантного штаммов, получены образцы сухих концентрированных ФП. Исследована эффективность их использования на стадии осахаривания ржаного сусла.

Подготовку ржаного сусла осуществляли по механико-ферментативной схеме при гидромодуле 1:3. Исследуемые ФП вносили на стадии осахаривания в дозировке 5 мг ФП/100 г сырья. В полученном сусле определяли вязкость. Сбраживание осахаренной массы осуществляли при 35° в течение 65 ч дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* У-717. Бражку анализировали согласно принятым для спиртового производства методам.

Полученные результаты показали (рис. 1), что увеличенная активность ферментов в ФП2, полученном на основе нового мутантного штамма, способствовала существенному снижению вязкости сусла – на 9%, и содержания остаточных редуцирующих веществ (ОРВ) в бражке – на 7%. За счет применения ФП на основе более активного продуцента выход спирта увеличился на 2%.

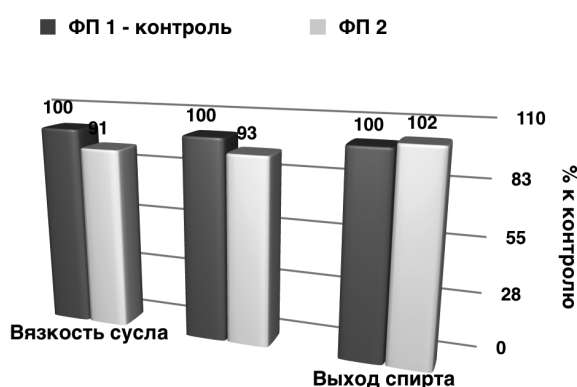


Рисунок 1. Вязкость сусла и основные показатели бражки при использовании на стадии осахаривания ФП1 и ФП2, полученных на основе исходного и мутантного штаммов *T. reesei*

Проведенные исследования показали перспективность применения ФП целлюлолитического и гемицеллюлолитического действия на основе нового мутантного штамма *T. reesei*-28-U-12 в спиртовой отрасли на стадии осахаривания ржаного сусла.

Работа выполнена в рамках Гос. задания № 0529-2016-0045.

UDC 663.15: 663.531

## EFFICIENCY OF A NEW TRICHODERMA REESEI ENZYME PREPARATION WITH INCREASED XYLANASE AND ENDOGLUCANASE ACTIVITY IN THE PROCESS OF RYE WORT SACCHARIFICATION

Kostyleva E.V.<sup>1</sup>, Tsurikova N.V.<sup>1</sup>, Sereda A.S.<sup>1</sup>, Velikoretskaya I.A.<sup>1</sup>, Aisina A.M.<sup>2</sup>, Mihaylichenko E.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – a branch of the Federal State Budget Institution of Science, Federal Research Centre of food, biotechnology, and food safety, Samokatnaya str., 4b, Moscow, 111033, Russia  
e-mail: ekostyleva@list.ru

<sup>2</sup> Moscow state university of food production (MSUFP), 125080, Moscow, Volokolamskoye sh., 11

<sup>3</sup> Moscow Polytechnic University, 107023, Moscow, Bolshaya Semenovskaya St., 38

The effectiveness of the enzyme preparation obtained on the basis of a new mutant *Trichoderma reesei* strain with increased xylanase and endoglucanase activity was studied in the saccharification of rye wort. It was found that the improved composition of the preparation contributes to an increase in the ethanol yield, a decrease in the wort viscosity, and the content of the residual reducing substances in distiller's wort.

**Key words:** xylanase, endoglucanase, *Trichoderma reesei*, rye wort

In Russia ethanol is produced mainly from cereals containing a large amount of non-starch polysaccharides (NSP): xylans,  $\beta$ -glucans, cellulose. NSP increase the viscosity of water-flour suspensions reducing the technological process efficiency. The use of cellulolytic and hemicellulolytic enzyme preparations (EP) hydrolyzing NSP significantly reduces the viscosity of the grain mash, increases the final product yield, ensures a more complete raw materials utilization, allows obtaining wort with a high concentration of solids, which is especially important for the resource-saving technologies of ethanol production [1, 2].

In VNIIPBT using UV-mutagenesis and selection, *Trichoderma reesei* 28-U-12 strain was obtained with increased activity of endoglucanase and xylanase by 30% and 80%, respectively, which increases its efficiency in hydrolysis of the main NSP of wheat and rye. A culture liquid of the parent and mutant strains was grown in laboratory fermenters; samples of dry concentrated EPs were obtained. The effectiveness of their application in the rye wort saccharification was studied.

Preparation of rye wort was carried out according to the mechano-enzymatic scheme with the grain to water ratio of 1:3. The EP samples were introduced at the saccharification stage at a dosage of 5 mg EP / 100 g of raw material. In the resulting wort viscosity was determined. The fermentation of the saccharified wort was carried out



at 35° for 65 h by *Saccharomyces cerevisiae* U-717 yeast. Distiller's wort was analyzed according to the methods adopted for alcohol production.

The obtained results showed (Figure 1) that the increased activity of enzymes in EP2, obtained on the basis of a new mutant strain, contributed to a significant decrease in the viscosity of the wort - by 9%, and the content of residual reducing substances (RRS) in the distiller's wort - by 7%. Due to the application of EP from the more active strain, the ethanol yield increased by 2%.

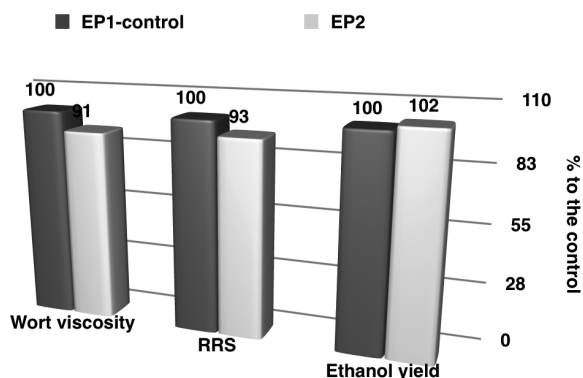


Figure 1. Viscosity of wort and the main indicators of distiller's wort when using EPs obtained on the basis of the initial and mutant strains *T. reesei*

The conducted studies have shown the prospects of using cellulolytic and hemicellulolytic EP on the basis of the new mutant strain *T. reesei*-28-U-12 in the ethanol production at the stage of rye wort saccharification.

The work was done within the framework of the government assignment no. 0529-2016-0045.

УДК 663.5

## ЭФФЕКТИВНЫЙ КОНТРОЛЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА СПИРТА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ

Медриш М.Э., Абрамова И.М., Поляков В.А., Павленко С.В.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия  
111033, г. Москва, ул. Самокатная, дом 4б.  
e-mail: [technohimkontrol@mail.ru](mailto:technohimkontrol@mail.ru)

Разработана методика одновременного определения углеводов и органических кислот в полупродуктах спиртового производства с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с рефрактометрическим детектированием.

**Ключевые слова:** углеводы, органические кислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография, рефрактометрический детектор.

Современные технологии производства спирта из зернового сырья направлены на получение высококачественного конечного продукта[1].

При сбраживании зернового сусле изменяется обмен веществ спиртовых дрожжей, что приводит к необходимости контроля процессов их метаболизма [2]. Проведение мониторинга технологического процесса производства спирта с использованием инструментальных методов анализа позволяет своевременно выявлять нарушения и не допускать выпуска низкокачественного продукта.

Органические кислоты играют важную роль в метаболизме углерода, энергетическом обмене микроорганизмов, синтетических и диссимиляционных процессах. Среди органических кислот в зерновом сусле и бражке преобладают уксусная, яблочная, молочная, янтарная, излишнее количество которых оказывает ингибирующее действие на дрожжи [3]. Углеводы являются источником углерода для дрожжей. В первую очередь дрожжами потребляются глюкоза и фруктоза, при их отсутствии – мальтоза. Поэтому одновременное количественное определение содержания органических кислот и углеводов является важнейшей

и актуальной задачей в контроле спиртового производства [4].

Была разработана новая методика одновременного определения углеводов и органических кислот в полупродуктах спиртового производства с применением одного из наиболее востребованных инструментальных методов анализа - высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием рефрактометрического детектирования, позволяющим проводить высокочувствительный и точный анализ.

Установлен диапазон измерений массовых концентраций углеводов и органических кислот 0,001- 4,0 г/100 см<sup>3</sup>, градуировочные зависимости линейны с коэффициентом корреляции > 0,999 в диапазоне 0,1-1,0 г/100 см<sup>3</sup>. Нижний предел количественного определения составляет 0,001 г/100 см<sup>3</sup>.

Допускается применять метод для определения более высоких концентраций углеводов и органических кислот после разбавления проб деионизованной водой.

С применением разработанной методики были исследованы образцы суслу и бражки из различного зернового сырья. Полученные результаты позволяют оценить эффективность процесса спиртового производства.

Данная методика может применяться для мониторинга динамики изменения углеводного состава и органических кислот в процессе технологического процесса брожения, тем самым повышая эффективность контроля биотехнологического процесса производства спирта.

Работа по подготовке рукописи проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы (№ 0529-2014-0106).

#### Литература:

1. Абрамова И.М. Научное обоснование методологии комплексного контроля спиртового и ликероводочного производства с целью повышения качества и безопасности алкогольной продукции: Автореф. дис. докт. техн. наук. - Москва, 2014. - 51 с.
2. Римарева, Л.В. Влияние ферментативных систем на биохимический состав зернового суслу и культуральные свойства осмофильной расы спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Производство спирта и ликероводочных изделий. - 2013. - №1. - С. 18-19.
3. Серб, Е.М. Исследование метаболитов, сопутствующих синтезу этанола при сбраживании концентрированного зернового суслу осмофильным штаммом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Производство спирта и ликероводочных изделий. - 2013. - №2. - С. 16-19.
4. Маринченко В.А. Технология спирта. В.А. Маринченко, В.А. Смирнов, Б.А. Устинников. - М.: Легкая и пищевая пр-ть, 1981. - 416 с.

UDC 663.5

## EFFECTIVE CONTROL OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESS OF ALCOHOL PRODUCTION USING HPLC METHOD

Medrish M.E., Abramova I.M., Polyakov V.A., Pavlenko S.V.

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology - a branch of the Federal State budget institution of science of «Federal research centre of food, biotechnology and food safety», Moscow, Russia  
111033, Moscow, Samokatnaya str., 4b.  
e-mail: [technohimkontrol@mail.ru](mailto:technohimkontrol@mail.ru)

It has been developed a method for the simultaneous determination of carbohydrates and organic acids in semi-products of alcohol production using the method of high-performance liquid chromatography with refractometric detection.

**Key words:** carbohydrates, organic acids, high-performance liquid chromatography, refractometric detector.

Modern technologies of alcohol production from grain raw materials are aimed at obtaining a high-quality final product [1].

During the fermentation the grain wort is changed metabolism of alcohol yeast, which leads to the need to control the processes of their metabolism [2]. Conducting monitoring of the technological process of alcohol production using instrumental methods of analysis allows timely detection of violations and prevents the release of a low-quality product.

Organic acids play an important role in the metabolism of carbon, energy metabolism of microorganisms, synthetic and dissimilative processes. Among the organic acids in grain wort and mash are predominate acetic acid, malic acid, lactic acid, succinic acid, the excessive amount of which has an inhibitory effect on the yeast [3].

Carbohydrates are the source of carbon for yeast. First of all yeast will consume glucose and fructose, in their absence - maltose.

Therefore, simultaneous quantitative determination of the content of organic acids and carbohydrates is the most important and urgent task in controlling alcohol production process [4].

It has been developed a new method for simultaneous determination of carbohydrates and organic acids in semi-products of alcohol production using one of the most popular instrumental method of analysis - high-performance liquid chromatography with refractometric detection, which allows highly sensitive and accurate analysis.

A range of measurements of mass concentrations of carbohydrates and organic acids - 0,001 - 4,0 g/100 cm<sup>3</sup>, the calibration curves are linear with the correlation coefficient 0.999 in the range 0.1 - 1.0 g/100 cm<sup>3</sup>. The lower limit of quantification is 0.001 g /100 cm<sup>3</sup>.

New method can be used to determine higher concentrations of carbohydrates and organic acids after dilution with de-ionized water.

Using the developed technique, samples of wort and mash from various grain raw materials were investigated. The received results allow estimating efficiency of alcohol production process.

This method can be used to monitor the dynamics of changes in the carbohydrates and organic acids composition during the process of fermentation, thereby increasing the efficiency of controlling the biotechnological process of alcohol production.

Research work on the preparation of the manuscript was carried out at the expense of subsidies for the implementation of the state task in the framework of the Program of Fundamental research of the state academies of sciences for 2013-2020 (№ 0529-2014-0106).

*References:*

1. Abramova I.M. *Scientific substantiation of the methodology of integrated control over alcohol and distillery production with the purpose of improving the quality and safety of alcohol products: Abstract. dis. Doct. tech. sciences.* - Moscow, 2014. -51 p.
2. Rimareva, L.V. *Influence of enzymatic systems on the biochemical composition of grain wort and the cultural properties of the osmophilic race of alcoholic yeast Saccharomyces cerevisiae // Production of alcohol and alcoholic beverages.* - 2013. - №1. - P. 18-19.
3. Serba, E.M. *Investigation of metabolites accompanying the synthesis of ethanol during fermentation of concentrated grain wort by the osmophilous strain of yeast Saccharomyces cerevisiae // Production of alcohol and alcoholic beverages.* - 2013. - №2. - P. 16-19.
4. Marinchenko V.A. *Technology of alcohol.* V.A. Marinchenko, V.A. Smirnov, B.A. Ustinniki. - M.: Light and food pr-t, 1981. - 416 p.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ И ХИМИЯ БИОМАССЫ

### BIOMASS AND CHEMISTRY BIOTECHNOLOGY

1. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ БИОМАССЫ В ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ -УЧАСТНИКИ ПОЛИМЕРНОГО СИНТЕЗА, Маслова О.В., Сенько О.В., Ефременко Е.Н. ....	700
BIOTRANSFORMATION OF BIOMASS INTO ORGANIC ACIDS USED FOR POLYMER SYNTHESIS, Maslova O. V., Senko O. V., Efremenko E. N., Maslova O. V., Senko O. V., Efremenko E. N. ....	701
2. ВЛИЯНИЕ НОВОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГИДРОЗОЛЯ АКТИВИРОВАННОГО ТОРФА НА МЕРИСТЕМУ КОРНЕЙ ALLIUM CEPA, Косолапова Н.И. Сковороднева А.В. Миронов С.Ю. Мирошническо О.В. ....	702
THE INFLUENCE OF THE NEW BIOPREPARATION IN TERMS OF HYDROSOLE OF ACTIVATED PEAT OVER THE ROOT MERISTEM ALLIUM CEPA, Kosolapova N.I., Skovorodneva A.V., Mironov S.Yu., Miroshnichenko O.V. ....	703
3. ГЕТЕРОГЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ В ВИДЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ ТРАНСФОРМАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ БИОМАССЫ В БИОТОПЛИВА И БИОПОЛИМЕРЫ, Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Сенько О.В., Маслова О.В., Гладченко М. А., Никольская А.Б., Махлис Т.А., Лягин И.В., Гайдамака С. Н., Варфоломеев С.Д. ....	704
HETEROGENOUS BIOCATALYSTS IN THE FORM OF IMMOBILIZED CELLS IN THE PROCESSES TRANSFORMING VARIOUS TYPES OF BIOMASS TO BIOFUELS AND BIOPOLYMERS, Efremenko E.N., Stepanov N.A., Senko O.V., Maslova O.V., Gladchenko M.A., Nikolskaya A.B., Makhlis T.A., Lyagin I.V., Gaidamaka S.N., Varfolomeev S.D. ....	705
4. ГИБРИДЫ ТИПА «КЛЕТКА В ОРГАНОСИЛИКАТНОЙ ОБОЛОЧКЕ»: ФОРМИРОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗА, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ, Д.Г.Лаврова, О.Н.Понаморева ....	705
CONDITIONS OF SOL-GEL SYNTHESIS AND PROSPECTS FOR THE APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY, D.Lavrova, O.Ponomoreva ....	706
5. ДЕЙСТВИЕ СЛАБОГО НИЗКОЧАСТОТНОГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ МИКРОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ, Макаров И. О., Ключев Д. А., Смирнов В. Ф., Смирнова О. Н., Аникина Н. А., Захарова Е. А., Яковлева А. А. ....	707
EFFECT OF WEAK LOW-FREQUENCY PULSED MAGNETIC FIELD AND LOW LEVEL LASER RADIATION ON GROWTH AND OXIDOREDUCTASE ACTIVITY OF FUNGI – ACTIVE DECOMPOSERS OF POLIMERIC MATERIALS, Makarov I.O., Kluev D.A., Smirnov V.F., Smirnova O.N., Anikina N.A., Zaharova E.A., Iakovleva A.A. ....	708
6. ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ СИЛАНОВЫХ ПРЕКУРСОРОВ, ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА И МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПЛЕНОК, О. А. Каманина ....	709
SOL-GEL MATERIALS BASED ON SILANE PRECURSORS, POLYVINYL ALCOHOL AND MICROORGANISMS FOR OBTAINING BIOLOGICAL FILMS, O.Kamanina ....	709
7. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ РОСТА ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ БИОВСКРЫТИЯ ХВОСТОВ ОБОГАЩЕНИЯ, Д.Р.Магомедов, А.К.Койжанова, Э.М.Камалов, М.Б.Ерденева, Ж.Д.Жанабай ....	710
RESEARCHING OF THE PHYSIOLOGY OF THE GROWTH OF HEMOLITHOTROPHIC MICROORGANISMS IN THE PROCESS OF BIO-DISSECTION OF TAILS OF BENEFICATION, D.Magomedov, A.Koizhanova, E.Kamalov, M.Erdenova, Z.Zhanabai ....	712
8. ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОМАССЫ LACTOBACILLUS PARACASEI В ГЕЛЕВЫХ МАТРИЦАХ НА ОСНОВЕ КОВАЛЕНТНО-СШИТЫХ ПОЛИМЕРОВ, Шустов М. Д., Галеева Ю. С., Белодед А. В., Кузнецов А. Е. ....	713
IMMOBILIZATION OF LACTOBACILLUS PARACASEI BIOMASS IN COVALENT-LINKED POLYMER BASED GEL MATRIX, Shustov M. D., Galeeva J. S., Beloded A. V., Kuznetsov A. E. ....	714
9. ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНЫХ РЕСУРСОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, Ха Т.З., Хусаинов И.А., Канарская З.А., Канарский А.В. ....	715
INTENSIFICATION OF BIOCATALYTIC METHODS OF OBTAINING NUTRIENT MEDIA FOR CULTIVATION OF MICROORGANISMS ON THE BASIS OF SECONDARY RESOURCES OF PROCESSING PLANT RAW MATERIALS, Ha T.Z., Khusainov I. A., Kanarskaya Z.A., Kanarskiy A. ....	716

10. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ <i>PENICILLIUM CANESCENS</i> В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАККАЗ <i>TRAMETES HIRSUTA</i> , Савинова О.С., Васина Д.В., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Рожкова А.М., Тяжелова Т.В., Сеницын А.П., Федорова Т.В. ....	716
USING OF <i>PENICILLIUM CANESCENS</i> AS A SYSTEM FOR EXPRESSION OF <i>TRAMETES HIRSUTA</i> LACCASE ISOZYMES, Savinova O.S., Vasina D.V., Chulkin A.M., Vavilova E.A., Rozhkova A.M., Tyazhelova T.V., Sinitsyn A.P., Fedorova T.V. ....	718
11. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В КАЧЕСТВЕ ДЕТОКСИЦИРУЮЩИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ АНТИБИОТИКОВ, М.М.Леонтьева, Е.Д.Дмитриева ....	719
USE OF HUMIC SUBSTANCES AS A DETOXIFYING AGENT FOR INACTIVATION OF ANTIBIOTICS, M.Leontyeva, E.Dmitrieva ....	720
12. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> И СИНТЕЗ КСАНТАНА НА СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫЕ ГИДРОЛИЗАТЫ И ПОБОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ, Шустов М. Д., Парамонов Д. А., Мельников Е., Белодед А. В. ....	721
<i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> CULTIVATION AND XANTHAN SYNTHESIS ON NUTRIENT MEDIA CONTAINING VEGETABLE HYDROLYSATES AND SIDE PRODUCTS OF FOOD INDUSTRY, Shustov M. D., Paramonov D. A., Melnikov E. A., Beloded A. V. ....	722
13. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ ОКСИГЕНАТОВ ИЗ УГЛЕВОДИСТОГО СЫРЬЯ, Вольева В. Б., Комиссарова Н. Л., Малкова А. В., Овсянникова М. Н., Усманов Р. А., Гумеров Ф. М. ....	723
MODERNIZATION OF BIOETHANOL PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSES MATERIALS AND BIODIZEL FROM PLANT TRIGLYCEROLS IS DEVELOPED, Vol'eva V. B., Komissarova N. L., Malkova A. V., Ovsyannikova M. N., Usmanov R. A., Gumerov F. M. ....	724
14. НОВЫЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ, А.В.Голышкин, Н.Р.Альмяшева, М.Ю.Зиангирова, Л.М.Краснопольская ....	724
16. NEW SUBSTRATES FOR PRODUCTION OF FRUIT BODIES OF XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETES, A.Golyshkin, N.Almyasheva, M.Ziangirova, L.Krasnopolskya ....	725
15. НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ КОРМОВОГО ПРИМЕНЕНИЯ, Сеницын А.П., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Сеницына О.А., Короткова О.Г., Осипов Д.О., Шашков И.А., Сатрутдинов А.Д., Рубцова Е.А., Кондратьева Е.Г., Волчок А.А. ....	726
NEW ENZYMES FOR FEED APPLICATIONS, Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M., Zorov I.N., Sinitsyna O.A., Korotkova O.G., Osipov D.O., Shashkov I.A., Satrutdinov A.D., Rubtsova E.A., Kondratieva E.G., Volchok A.A. ....	727
16. НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, Гусаков А.В., Булахов А.Г., Доценко А.С., Рожкова А.М., Волков П.В., Сеницын А.П. ....	727
NEW ENZYMES AND FACTORS AFFECTING THE ENZYMATIC DESTRUCTION OF CELLULOSE, Gusakov A.V., Bulakhov A.G., Dotsenko A.S., Rozhkova A.M., Volkov P.V., Sinitsyn A.P. ....	728
17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ <i>TRICHODERMA VIRIDE</i> , Епишкина Ю. М., Тур А. В., Баурин Д.В., Шакир И. В., Панфилов В. И. ....	729
DETERMINATION OF CELLULOLYTIC ACTIVITY OF <i>TRICHODERMA VIRIDE</i> , Epishkina. Y. M., Tur A. V., Baurin D.V., Shakir. I V., Panfilov. V.I. ....	731
18. ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ, Миронова Г.Ф., Кашеева Е.И., Скиба Е.А., Кухленко А.А. ....	731
OPTIMIZING THE COMPOSITION OF MULTI-ENZYME COCKTAIL TO PREPARE NUTRIENT BROTHS FROM CELLULOSIC FEEDSTOCKS, Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., Skiba E.A., Kukhlenko A.A. ....	732
19. ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ – ПРИРОДНЫЕ БИОРАЗРУШАЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ, Волова Т.Г., Жила Н.О., Киселев Е.Г., Шишацкая Е.И. ....	733
POLYHYDROXYALKANOATES – NATURAL BIODEGRADABLE POLYMERS, Volova T.G., Zhila N.O, Kiselev E.G. , Shishatskaya E.I. ....	734
20. ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛУПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ МЕТАНОКСИЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, Макарова М.И., Воронина В.А., Суясов Н.А., Яровая О.В. ....	735
OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE SEMI-FINISHED PRODUCTS BASED ON BACTERIAL BIOMASS OF METHANE OXIDIZING MICROORGANISMS, Makarova M.I., Voronina V.A., Suyasov N.A., Yarovaya O.V. ....	736

21. РАЗРАБОТКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И КОНСТРУКЦИОННЫХ БИОКОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МИКРОБНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ, Ревин В.В., Лияськина Е.В., Атыкян Н.А., Пестов Н.А., Новокупцев Н.В. ....	737
DEVELOPMENT OF PROMISING FUNCTIONAL AND CONSTRUCTIONAL BIOCOMPOSITE MATERIALS ON THE BASIS OF MICROBIAL POLYSACCHARIDES, Revin V.V., Liyaskina E.V., Atykyan N.A., Pestov N.A., Novokuptsev N.V. ....	738
22. РЕГУЛЯЦИЯ РОСТОВЫХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАСТЕНИЙ РАПСА СЕЛЕКТИВНЫМ СВЕТОМ НА ФОНЕ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ МЕДИ В СРЕДЕ, Данилова Е.Д., Коломейчук Л.В., Ефимова М.В. ....	739
REGULATION OF GROWTH AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF RAPE PLANTS BY THE SELECTIVE LIGHT UNDER COPPER STRESS CONDITIONS, Danilova E.D., Kolomeichuk L.V., Efimova M.V. ....	740
23. СИСТЕМА ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА В ГИДРОЛИЗАТЫ КАК КОМПОНЕНТЫ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВАХ, Понкратов А.С., Валеева Р.Т., Нуретдинова Э.И., Шурбина М.Ю., Понкратова С.А., Нуртдинов Р.М. ....	741
WASTE PROCESSING SYSTEM OF AGRO-INDUSTRIAL COMPLEX IN HYDROLYSATES AS COMPONENTS OF NUTRIENT ENVIRONMENT IN BIOTECHNOLOGY PRODUCTION, Ponkratov A.S., Ananyeva O.V., Ponkratova S.A., Valeeva R.T., Nuretdinova E.I., Shurbina M.Yu. ....	742
24. СКРИНИНГ И СРАВНИТЕЛЬНОЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВЫСОКОЛИПИДНЫХ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СТОЧНЫХ ВОДАХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА, Пилигаев А.В., Сорокина К.Н. Самойлова Ю.В., Пармон В.Н. ....	743
SCREENING AND COMPARATIVE METABOLIC PROFILING OF HIGH LIPID STRAINS OF MICROALGAE DURING CULTIVATION IN WASTEWATER FOR BIOFUEL PRODUCTION, Piligaev A.V., Sorokina K.N., Samoylova Y.V., Pamon V.N. ....	744
25. СКРИНИНГ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОИСКА ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ, Гордонова И.К., Никитина З.К. ....	744
SCREENING OF MICROMYCETES FOR CELLULASES PRODUCERS SEARCH, Gordonova I.K., Nikitina Z.K. ....	745
26. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЕКТИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ПИРОЛИЗА УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ ПРИ ОСЦИЛЛИРУЮЩЕЙ ТЕМПЕРАТУРЕ, Быков В.И., Цыбенкова С.Б., Ломакин С.М., Варфоломеев С.Д. ....	746
THEORETICAL FOUNDATIONS OF THE DESIGNING OF THE PYROLYSIS PROCESS OF CARBONACEOUS FEEDSTOCK AT OSCILLATING TEMPERATURE, Bykov V.I., Tsybenova S.B., Lomakin S.M., Varfolomeev S.D. ....	747
27. ФОРМИРОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОАНОДОВ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ БИОКАТАЛИЗАТОРОМ В МЕДИАТОРНЫХ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ, С. В. Алферов А. П. Калейник В. О. Паславская ....	748
DEVELOPMENT AND APPLICATION OF BIOANODES WITH IMMOBILIZED BIOCATALYST FOR MEDIATED BIOFUEL CELLS, S.V. Alferov, A.P. Kaleynik, V.O. Paslavskaya ....	749
28. ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ХИМИКО-ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ БИОМАССЫ В БАКТЕРИАЛЬНУЮ ЦЕЛЛЮЛОЗУ, Е.И.Кашеева ....	749
FUNDAMENTALS OF CHEMICAL ENZYMATIC TRANSFORMATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS INTO BACTERIAL CELLULOSE, E.Kashcheyeva ....	750
29. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГИДРОЗОЛЯ АКТИВИРОВАННОГО ТОРФА ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ, Косолапова Н.И., Проценко А.А., Мирошниченко О.В., Проценко Е.П. ....	751
THE EFFECTIVENESS OF THE BIOPREPARATION'S APPLIANCE IN TERMS OF HYDROSOLE OF ACTIVATED PEAT DUE TO CULTIVATING OF WINTER WHEAT, Kosolapova N.I., Protsenko A.A., Miroshnichenko O.V., Protsenko E.P. ....	752
30. ЭФФЕКТИВНЫЙ КОНТРОЛЬ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА СПИРТА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ, Павленко С.В., Абрамова И.М, Поляков В.А., Медриш М.Э. ....	754
EFFECTIVE CONTROL OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESS OF ALCOHOL PRODUCTION USING HPLC METHOD, Pavlenko S.V., Abramova I.M., Polyakov V.A., Medrish M.E. ....	755
31. ЭКСПРЕССИЯ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА В ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЯХ (FESTUCA PRATENSIS Н.), ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ, А. Мурташ, М. Яскулак, А. Рорат, З. Шаабене, А. Гробелак, М. Каспрчак, Ф. Ванденбулке ....	756

EXPRESSION OF METALLOTHIONEIN IN GRASS (FESTUCA PRATENSIS H.) EXPOSED TO HEAVY METALS, A.Murtaś, M.Jaskulak, A.Rorat, Z.Chaabene, A.Grobelak, M.Kacprzak, F.Vandenbulcke .....	758
32. ЭКСПРЕССИЯ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ И ДРУГИХ МАРКЕРОВ СТРЕССА У РАСТЕНИЙ, ПОДВЕРГАЮЩИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, М. Яскулак, А. Мурташ, А. Рорат, З. Шаабене, А. Гробелак, М. Каспрчак, Ф. Ванденбулке .....	759
EXPRESSION OF METALLOTHIONEINS AND OTHER STRESS MARKERS IN PLANTS EXPOSED TO HEAVY METALS AND SILVER NANOPARTICLES, M.Jaskulak, A.Murtaś, A.Rorat, A.Grobelak, Z.Chaabene, M.Kacprzak, F.Vandenbulcke .....	760

УДК 547.32; 541.64

## БИОТРАНСФОРМАЦИЯ БИОМАССЫ В ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ – УЧАСТНИКИ ПОЛИМЕРНОГО СИНТЕЗА

**Маслова О.В., Сенько О.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

Актуальным является разработка экономически обоснованных зеленых технологий получения биопластиков из возобновляемого сырья, в том числе из отходов. При помощи биокатализаторов биомасса может быть трансформирована в ряд органических кислот – участников процессов синтеза коммерчески значимых, в ряде случаев, биосовместимых и биоразлагаемых, полимеров.

**Ключевые слова:** органическая кислота, биокатализатор, иммобилизованные клетки, биомасса, биополимеры, зеленая экономика.

Вопрос накопления пластиковых небиodeградируемых отходов является сегодня одной из глобальных проблем человечества. Поиск ответов на этот вопрос лежит в области развития биodeградируемых пластиков из сырья, альтернативного углеводородному. Так в 2001 г. на мировой рынок был выведен такой новый продукт как полилактид, для его производства использовалась молочная кислота, получаемая биокаталитическим способом из биовозобновляемых ресурсов. Этим событием была открыта новая страница в развитии биополимерной химии, целью которой является постепенный экономически обоснованный переход от пластмасс и полимеров, получаемых традиционным способом из невозобновляемых углеводородных ресурсов (нефтепродуктов и природного газа), к пластикам, получаемым при использовании возобновляемого сырья.

Благодаря наличию карбоксильных и некоторых других функциональных групп ряд органических кислот (ОК) биокаталитического происхождения и их производные в настоящее время уже признаны перспективными и широко используются на разных стадиях в процессах получения полимерных материалов. Большинство ОК используется в качестве мономеров для химического синтеза полиэфиров или сополимеров на их основе: акриловая, аспарагиновая, гликолевая, глюкарная, итаконовая, α-кетоглутаровая, молочная, терефталевая, фумаровая, яблочная и янтарная. Для химического синтеза полиамидов используют диамины и диосновные алифатические кислоты: адипиновую (нейлон-6,6), азелаиновую, янтарную, глюкарную, себациновую, димеры диоксикилот и некоторые другие производные. Сложные полиэфиры кислот с концевыми ОН-группами, например, линейные продукты поликонденсации адипиновой, фталевой и других дикарбоновых кислот с этилен-пропилен-, бутилен- или другими низкомолекулярным гликолями, используются в качестве гидроксилсодержащих компонентов в производстве полиуретанов. Известно использование ОК (итаконовой, акриловой и др.) для придания новых свойств каучукам и латексам в ходе их карбоксилирования с получением, так называемых, карбоксилатных и нитрилкарбоксилатных каучуков и композитных материалов. Отдельные ОК используются в качестве пластификаторов при получении биопластиков с заданными свойствами, например, капроновая, лауриновая и другие жирные кислоты, а также лимонная кислота. Некоторые биоразлагаемые полимеры на основе ОК могут синтезироваться клетками микроорганизмов. Например, полигидроксиалканоаты – на основе различных гидроксикислот, полиглутаминовая кислота – на основе глутаминовой кислоты, полияблочная кислота – на основе яблочной кислоты и полисахарид – гиалуроновая кислота – на основе глюкуроновой кислоты и ацетилглюкозамина.

Промышленная реализация многих процессов получения ОК из биомассы ограничена низкой продук-

тивностью биокатализаторов, низкими выходами продуктов на стадиях выделения и очистки и, как следствие, высокой неконкурентоспособной себестоимостью продукта. Улучшение качественных характеристик сырья, использование иммобилизованных и/или генетически-модифицированных продуцентов, мембранных технологий выделения позволяют снизить себестоимость продукции. Повышенным рыночным потенциалом сегодня характеризуются ОК, биополимеры на основе которых находят применение в медицинской химии и фармацевтической отрасли, например, молочная, янтарная, фумаровая, гликолевая, итаконовая, аспарагиновая, глутаминовая, 3-гидроксикислоты.

UDC 547.32; 541.64

## BIOTRANSFORMATION OF BIOMASS INTO ORGANIC ACIDS USED FOR POLYMER SYNTHESIS

Maslova O. V., Senko O. V., Efremenko E. N.

Lomonosov Moscow State University, 1/3 Lenin Hills, 119991, Moscow, Russia  
E-mail: olga.maslova.rabota@gmail.com

The development of economically sound green technologies for the production of bioplastics using renewable raw materials, including waste, is of immediate importance. Biocatalysts can be used to transform biomass into a number of organic acids that participate in the synthesis of commercially significant and, in some cases, biocompatible and biodegradable polymers.

**Key words:** organic acid, biocatalyst, immobilized cells, biomass, biopolymers, green economy.

Today the issue of accumulating biodegradable plastic waste comprises one of the global problems facing humanity. Answers to this question may be found in the development of biodegradable plastics manufactured from raw materials that are alternative to hydrocarbons. In 2001 a new product – polylactide – was introduced to the world market. It is produced using lactic acid, which is obtained biocatalytically from bio-renewable resources. This event opened a new page in the development of biopolymer chemistry that is aimed at a gradual economically feasible transition from plastics and polymers traditionally obtained from non-renewable hydrocarbon resources (oil products and natural gas) to plastics produced using renewable raw materials.

Carboxyl and some other functional groups have enabled the recognition of a number of organic acids (OAs) of biocatalytic origin and their derivatives as promising as well as their wider application at different stages in the production of polymeric materials. Most OAs are used as monomers for the chemical synthesis of polyesters or copolymers based on them (acrylic, aspartic, glycolic, glucaric, itaconic,  $\alpha$ -ketoglutaric, lactic, terephthalic, fumaric, malic and succinic acids). In the chemical synthesis of polyamides, diamines and dibasic aliphatic acids (adipic (nylon-6,6), azelaic, succinic, glucaric, sebacic acids, dimers of dioxo acids and some other derivatives) are used. Complex polyesters of acids with terminal OH-groups, for example, linear polycondensation products of adipic, phthalic and other dicarboxylic acids with ethylene-propylene, butylene or other low-molecular glycols, are used as hydroxyl-containing components in the production of polyurethanes. Some OAs (itaconic, acrylic, etc.) are known to be used in order to give new properties to rubbers and latexes during their carboxylation, which results in the production of carboxylate and nitrile carboxylate rubbers and composite materials. Certain OAs are used as plasticizers in the production of bioplastics with specified properties (for example, caproic, lauric and other fatty acids, as well as citric acid). Some biodegradable OAs-based polymers can be synthesized by cells of microorganisms: for example, polyhydroxyalkanoates based on various hydroxy acids; polyglutamic acid based on glutamic acid; polymalic acid based on malic acid, and polysaccharide – hyaluronic acid – based on glucuronic acid and acetylglucosamine.

The industrial prospects for many processes of obtaining OAs from biomass are limited by the low productivity of biocatalysts, low yields of products during separation and purification stages and, as a result, a high noncompetitive cost of the product. The improved qualitative parameters of raw materials and the use of immobilized and/or genetically modified producers and membrane separation technology can reduce the cost of production. Today OAs that are involved in the production of biopolymers for medical chemistry and pharmaceutical industry (for example, lactic, succinic, fumaric, glycolic, itaconic, aspartic, glutamic, and 3-hydroxy acids) have a higher market potential.



УДК 57.044:576.08

## ВЛИЯНИЕ НОВОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГИДРОЗОЛЯ АКТИВИРОВАННОГО ТОРФА НА МЕРИСТЕМУ КОРНЕЙ ALLIUM SERA

Косолапова Н.И. Сковороднева А.В. Мионов С.Ю. Мирошническо О.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный университет»  
 г. Курск, Россия  
 30500, ул. Радищева, д. 33  
 E-mail: Nataliko7@yandex.ru

Исследовано влияние нового биопрепарата «CAVITA BIOCOMPLEX» на меристематическую активность Allium sera.

**Ключевые слова:** гуминовые биопрепараты, Allium-test

В настоящее время на рынок поступает большое количество гуминовых препаратов, для получения которых используются разные технологии и виды сырья. Нестехиометричность состава молекул гуминовых веществ (ГВ), зависимость их строения от источника и способа выделения обуславливают необходимость индивидуальной оценки биологической активности каждого выпускаемого препарата. При оценке биологической активности и экологической безопасности многих физических и биологических факторов, химических веществ, в т.ч. природного происхождения, хорошо зарекомендовал себя Allium-test. Данная тест-система позволяет выявить митостатическое или митозстимулирующее действие фактора, а также дозозависимость цитогенетического эффекта от концентрации воздействующего вещества [1].

Целью исследования стало изучение биологической активности нового биопрепарата «CAVITA BIOCOMPLEX», представляющего собой гидрозоль торфа активированного с использованием технологии ультразвуковой кавитационной обработки [3]. Исследования образцов гидрозоля при помощи растрового электронного микроскопа FEIQuanta 650 FEG в режиме высокого вакуума (давление в камере  $3 \times 10^{-3}$  Па) показали, что дисперсная фаза золя представлена наноразмерными частицами, которые склонны к агрегации с образованием аморфных структур, размер которых лежит в микрометровом диапазоне. Основными биологически-активными компонентами препарата можно считать гуминовые кислоты, содержание которых в нем составляет в среднем 50-55%.

Для выявления влияния различных доз препарата на меристему корней Allium sera готовили серию его растворов с концентрациями 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2,5% и 3%. Митостатическое и митозстимулирующее действие каждого раствора оценивали по стандартной методике [2]. Параллельно проводили определение морфометрических показателей растений, участвующих в эксперименте, в частности, следили за средней длиной корней. Исследования проводили в двукратной повторности. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета анализа данных программы MS Excel 2007. Результаты проведенного исследования представлены на рис. 1.

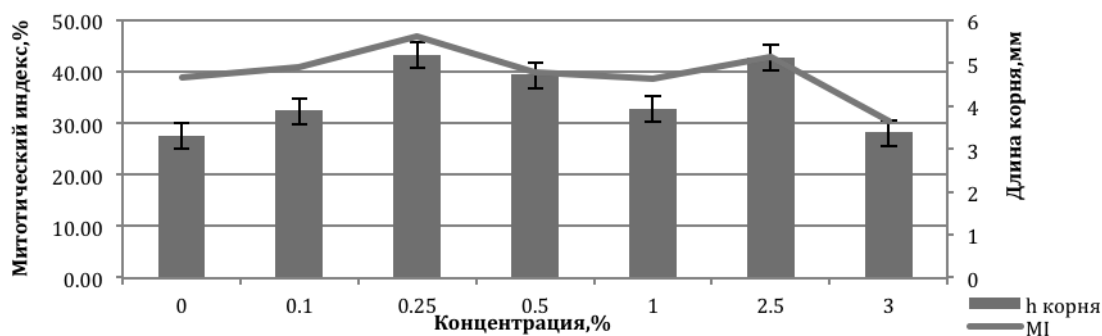


Рис. 1. Влияние биопрепарата «CAVITA BIOCOMPLEX» на деление клеток корневой меристемы и развитие корневой системы Allium sera

Установлено, что обе зависимости определяемых показателей от концентрации имеют бимодальный характер с максимумами при концентрациях препарата 0,25% и 2,5% и положительно коррелируют между

собой ( $R^2=0,78$ ), что свидетельствует об отсутствии цитотоксического действия.

Литература:

1. Шереметьева А.С. *Allium test* в исследованиях цитогенетических эффектов биологически активных веществ // Экспертное мнение. Сборник статей Международной научно-практической конференции, ч. 1. – 2017. – С. 21-25.
2. Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евсеева Т.И., Глазер В.М. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. Учебное пособие для вузов. – 2-е изд., испр. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. 288 с.
3. Патент 2533235 Российская Федерация. Способ получения биогеля и биогель. О.В. Володина, А.В. Смородько. Заявл. 03.07.2013; опубл. 07.08.2014.

UDC 57.044:576.08

## THE INFLUENCE OF THE NEW BIOPREPARATION IN TERMS OF HYDROSOLE OF ACTIVATED PEAT OVER THE ROOT MERISTEM ALLIUM CEPA

**Kosolapova N.I., Skovorodneva A.V., Mironov S.Yu., Miroshnichenko O.V.**

*Kursk State University  
Russia, 305000, Kursk, Radishcheva st., 33  
E-mail: Nataliko7@yandex.ru*

The influence of the new biopreparation «CAVITA BIOCOMPLEX» over the meristematic activity *Allium cepa* has been investigated.

**Key words:** humic biopreparations, *Allium-test*

Nowadays a lot of humic biopreparations are entering the market. Different technologies and types of raw materials are used to produce these biopreparations. Nonstoichiometry of molecular composition of humic substances, the dependence of their structure on the source and the method of isolation determine the necessity to provide an individual estimation of the biological activity of each produced preparation. According to the estimation of the biological activity and the environmental safety of many physical and biological factors, chemicals, incl. naturally occurring, *Allium-test* has proved itself well. This test-system enables to reveal the mitostatic action or the mito-stimulating effect of the factor and it also enables to reveal the dose dependence of the cytogenetic effect on the concentration of the acting substance [2].

The aim of the investigation has been to study the biological activity of the new biopreparation «CAVITA BIOCOMPLEX», which is hydrosol of activated peat in connection with the technology of ultrasonic cavitation processing [3]. The investigations of the samples of hydrosol with the help of scanning electron microscope FEIQuanta 650 FEG in terms of high vacuum (chamber pressure  $3 \times 10^{-3}$  Pa) have shown that the dispersed phase of sol is presented by nanosize particles, which are prone to agglomeration with the formation of amorphous structures, the size of which is over the micrometric range. As the main biologically active components of the preparation can be considered humic acids, the content of which in this preparation is on the average 50-55%.

To determine the influence of the different doses of the preparation on the root meristem *Allium cepa* there have been prepared the dilution series with the following concentrations: 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5% and 3%. The mitostatic action and the mito-stimulating effect of each solution have been estimated according to the standard procedure [1]. In parallel with it there has been done a determination of morphometric parameters of the plants, involved in the experiment, in particular, the average root length have been monitored. The investigations have been carried out with double frequency. The statistical processing has been done with the help of analysis package of MS Excel 2007. The results of the research are shown in Fig. 1.

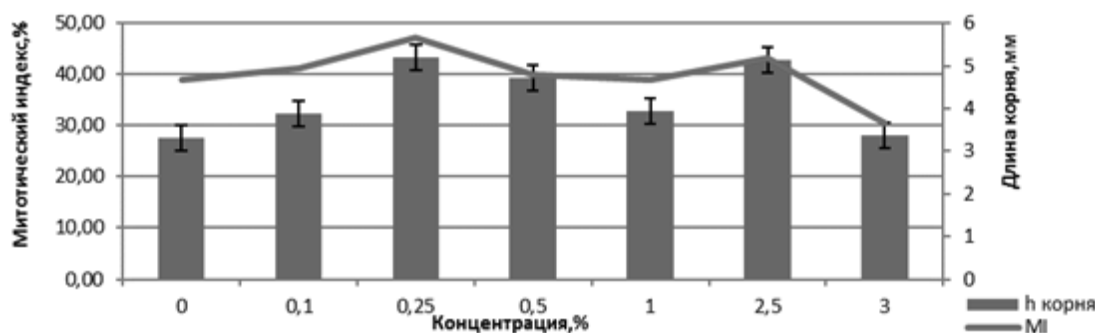


Fig. 1. The influence of the biopreparation «CAVITA BIOCOMPLEX» on cell fission of the root meristem and the development of root system *Allium cepa*.

It has been found out that both dependences of the identifiable parameters on the concentration have a bimodal character with maximums under the preparation's concentration of 0.25% and 2.5%. They positively correlate with each other ( $R^2=0.78$ ). It proves that there is no cytotoxic action.

References:

1. Melekhova O.P., Egorova E.I., Evseeva T.I., Glaser V.M. "Biological control of the environment: bioindication and biotesting". Student training manual: the 2nd edition, added. Moscow: Publishing center "Academiya", 2007, pp. 288.
2. Sheremeteva A.S. "Allium test is in the investigations of cytogenetic effects of biologically active substances", Expert opinion. Collection of articles of the International Scientific and Practical Conference, part 1, 2017, pp. 21-25.
3. Patent 2533235 the Russian Federation. "The way of getting biogel. Biogel." /Smorodko A.V., Volodina O.V., register 03.07.2013, publ. on November 20, 2014

УДК 579.6

## ГЕТЕРОГЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ В ВИДЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССАХ ТРАНСФОРМАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ БИОМАССЫ В БИОТОПЛИВА И БИОПОЛИМЕРЫ

Ефременко Е.Н., Степанов Н.А., Сенько О.В., Маслова О.В., Гладченко М. А., Никольская А.Б., Махлис Т.А., Лягин И.В., Гайдамака С. Н., Варфоломеев С.Д.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
 Россия, 119991, Москва, Ленинские горы 1, строение 3  
 e-mail: elena\_efremenko@list.ru

Разработан ряд биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток различных микроорганизмов, которые обладают повышенной функциональной активностью в процессах трансформации разнообразных видов биомассы, различающихся по своему химическому составу, в разные виды биотоплива и биополимеры

**Ключевые слова:** иммобилизованные клетки, повышенная продуктивность, включение в носитель, гидролизаты возобновляемого сырья, отходы производства

Гетерогенные биокатализаторы, разработанные на основе клеток разнообразных микроорганизмов (бактерий, дрожжей и грибов) использовались для конверсии гидролизатов различных видов биомассы (однолетних и многолетних растений, отходов сельского и муниципального хозяйства, промышленности, биомассы штормовых выбросов водорослей, аэробных активных илов) в ходе разных биотехнологических процессов в разные виды биотоплива (биоэтанол, биобутанол, биоводород, биогаз) и биополимеры (бактериальная целлюлоза, декстан, пуллулан, альгинат). При этом были установлены множественные преимущества подобных биокаталитических систем и процессов перед традиционно применяемыми, использующими преимущественно растущие суспензионные культуры. Обсуждаются современные научные результаты по исследованию причин высокой стабильности гетерогенных биокатализаторов в виде иммобилизованных клеток в различных процессах, осуществляемых ими, связь получаемых характеристик этих биокаталитических процессов с проявляемыми клетками свойствами и реализацией генетически

запрограммированного в них кворумного ответа на создание использование в биотехнологии их высококонцентрированных популяций, а также общие закономерности в проявлении этого феномена у клеток про- и эукариотов.

Работа частичной выполнена при финансовой поддержке со стороны РФФИ (грант 16-08-00457).

UDC 579.6

## **HETEROGENOUS BIOCATALYSTS IN THE FORM OF IMMOBILIZED CELLS IN THE PROCESSES TRANSFORMING VARIOUS TYPES OF BIOMASS TO BIOFUELS AND BIOPOLYMERS**

**Efremenko E.N., Stepanov N.A., Senko O.V., Maslova O.V., Gladchenko M.A., Nikolskaya A.B., Makhlis T.A., Lyagin I.V., Gaidamaka S.N., Varfolomeev S.D.**

*M.V. Lomonosov Moscow State University,  
Lenin's Hills, 1/3, Moscow, 119991, Russia  
e-mail: elena\_efremenko@list.ru*

A number of new biocatalysts in the form of immobilized cells of different microorganisms were developed, and they possessed an increased functional activity in the processes transforming various types of biomass varying in its chemical content into numerous variants of biofuels and biopolymers

**Key words:** immobilized cells, increased productivity, introduction in to carriers, hydrolysates of renewable sources, different biodegradable wastes

Heterogeneous biocatalysts developed on the basis of cells of different microorganisms (bacteria, yeasts, filamentous fungi) were used for conversion of components of variable hydrolysates obtained as results of treatment of various types of biomass (biomass of annual and perennial plants, bulk of biodegradable wastes of industry, agriculture and municipal economy, biomass of storm burst of macroalgae, biomass of aerobic sludge) into manifold variants of biofuels (bioethanol, biobutanol, biohydrogen, biogas) and biopolymers (bacterial cellulose, dextran, pullulan, alginate) in the frame of diverse biotechnological processes. The multiple advantages of such biocatalysts and processes based on their application over similar and regular biocatalytic systems using presumably growing suspended cultures were revealed. The modern scientific results of investigation of the reasons of high stability of heterogeneous biocatalysts in the form of immobilized cells in different processes catalyzed by them, the interrelation between obtained parameters of the biocatalytic processes and characteristics of the cells as well as formation and present triggers of genetically programmed respond as a Quorum sensing of cells as their reaction on the creation and use of high cell concentrated populations in biotechnological processes are discussed. Both pro- and eukaryotic cells are under discussion in relation to existence of general regularity in the manifestation of this phenomenon.

Work was partially supported with financial funds of Russian Foundation for Basic Research (Project No.16-08-00457).

УДК: 579.6:695:663

## **ГИБРИДЫ ТИПА «КЛЕТКА В ОРГАНОСИЛИКАТНОЙ ОБОЛОЧКЕ»: ФОРМИРОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗА, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**Д.Г.Лаврова, О.Н.Понаморева**

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тульский государственный университет», Россия, 300012, Тула, Проспект Ленина, 92, d.g.fedoseeva@gmail.com, 89539531492*

С использованием золь-гель технологий синтезированы гибридные материалы на основе инкапсулированных в органосиликатные оболочки микроорганизмов. На основе полученных материалов разработаны перспективные биокатализаторы для применения в экобиотехнологии.

**Ключевые слова:** Инкапсулированные микроорганизмы, «клетка в органосиликатной оболочке», гибрид-

ные материалы, золь-гель, кремнийорганические соединения, полиэтиленгликоль

Многие инновационные достижения инициированы живой природой. Например, объектом для подражания служат одноклеточные водоросли - диатомеи, на поверхности которых формируется силикатный экзо-скелет для обеспечения их защиты от неблагоприятных факторов окружающей среды и других микроорганизмов. Золь-гель метод является одним из подходов для создания «живых» материалов на основе соединений кремния со структурой «клетка в защитной оболочке».

В данной работе выявляли возможности инкапсулирования клеток микроорганизмов в условиях золь-гель синтеза. В качестве исходных соединений использовали силановые прекурсоры: тетраэтоксисилан и метилтриэтоксисилан, и полиэтиленгликоль, с помощью которого осуществляется направленное формирование структуры гибридного материала. Объектом инкапсулирования были выбраны метилотрофные дрожжи *Ogatea polymorpha* ВКМ Y-2559, которые характеризуются эффективной ферментативной системой окисления низкомолекулярным спиртов, поэтому их иммобилизация не приводила к потере активности клеток под действием образующегося в процессе гидролиза и конденсации силановых прекурсоров спирта.

Нам впервые удалось зафиксировать процесс самопроизвольного формирования частиц золя у поверхности клеток, что впоследствии приводило к образованию оболочки вокруг них. Каждая дрожжевая клетка являлась центром формирования органосиликатной капсулы. Выявлены защитные функции образующейся капсулы от действия УФ-излучения, экстремальных значений pH и ионов тяжелых металлов. Синтезированные гибридные материалы были использованы при разработке модельных биофильтров для очистки метанолсодержащих стоков и биосенсоров для обнаружения низкомолекулярных спиртов в сточных водах [1,2]. Таким образом, гибриды типа «клетки в органосиликатных оболочках» являются стабильными «живыми» материалами, которые обладают значительным инновационным потенциалом в биотехнологии.

#### Литература:

1. Ponamoreva O.N., Kamanina O.A., Alferov V.A. и др. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 67. p. 321–326.
2. Lavrova D.G., Ponamoreva O.N., Kamanina O.A. и др. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater: article // *Enzyme Microb. Technol.* 2016. V. 92. p. 94–98.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке РФФИ и Правительства Тульской области проект № 16-43- 710183 p\_a.

UDC 579.6:695:663

## HYBRIDS «CELL IN ORGANOSILICATE SHELL»: CREATING BIOMATERIALS IN CONDITIONS OF SOL-GEL SYNTHESIS AND PROSPECTS FOR THE APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY

D.Lavrova, O.Ponamoreva

Tula State University, Россия, 300012, Tula, Pr. Lenina, 92

Hybrid materials were synthesized by immobilizing yeast in organosilicate shell. Perspective biocatalysts based on the materials have been developed for application in biotechnology.

**Key words:** Encapsulated microorganisms, «cell in organosilicate shell», hybrid materials, sol-gel, organosilane compounds, polyethylene glycol

Many innovative achievements are inspired by nature. For example, unicellular algae - diatoms are used as an object for imitation, on their surface a silicate exoskeleton is formed. It provides protection of cells from adverse environmental factors and other microorganisms. The sol-gel method is one of the approaches for creating «living» materials with a «cell in a protective shell» structure based on silicone compounds.

In this study revealed the possibility of encapsulation microorganism cells in a sol-gel synthesis. Silane precursors: tetraethoxysilane and methyltriethoxysilane, and polyethylene glycol (PEG) were used as starting compounds. PEG was involved in the directed formation of the structure of the hybrid material. Methylotrophic yeast *Ogatea polymorpha* ВКМ Y-2559 was selected by the encapsulation object. The activity of these yeast cells

should not be affected by the presence of alcohols, as methylotrophic yeasts have an effective enzymatic system for their oxidation.

For the first time we were able to fix the process of spontaneous formation of sol particles at the surface of cells, this led to the formation of a shell around them. Each yeast cell was the center of the formation of the organosilicate capsule. The resulting capsule protects cells from the effects of UV radiation, extreme pH values and heavy metal ions. Therefore living hybrid materials we developed the perspective biocatalysts in the development of methanol biosensors and biofilters for methanol wastewater treatment [1-2]. Thus, hybrids with a «cell in a protective shell» structure are stable «living» materials that have significant innovative potential in biotechnology.

*References:*

1. Ponamoreva O.N., Kamanina O.A., Alferov V.A. et al. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 67. p. 321–326.
2. Lavrova D.G., Ponamoreva O.N., Kamanina O.A. et al. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater: article // *Enzyme Microb. Technol.* 2016. V. 92. p. 94–98.

**Grant:** The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research and Tula Region Government according to the research project № 16-43-710183 r\_a

УДК 579.22

## **ДЕЙСТВИЕ СЛАБОГО НИЗКОЧАСТОТНОГО ИМПУЛЬСНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ И НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РОСТ И АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ МИКРОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ**

**Макаров И. О., Клюев Д. А., Смирнов В. Ф., Смирнова О. Н., Аникина Н. А., Захарова Е. А., Яковлева А. А.**

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия  
603950, г.Нижний Новгород, пр.Гагарина, 23, корп. 5  
e-mail: biodeg@mail.ru*

Показано, что слабое низкочастотное импульсное магнитное поле и низкоинтенсивное лазерное излучение неоднозначно влияют на рост и активность оксидоредуктаз микромицетов - активных биодеградантов полимерных материалов. Отмечен дозозависимый эффект данных факторов на активность каталазы и пероксидазы грибов.

**Ключевые слова:** мицелиальные грибы, низкочастотное импульсное магнитное поле, низкоинтенсивное лазерное излучение, каталаза, пероксидаза

Известно, что микроскопические грибы обладают системами высокоактивных ферментов, осуществляющих разнообразные химические превращения сложных субстратов различного происхождения. Исследования, связанные с повышением деструктивной активности грибов, особенно актуальны при разработке технологий, связанных с утилизацией промышленных отходов и загрязнений. Напротив, подавление деструктивной активности микромицетов очень важно в плане предотвращения процессов биоповреждений промышленных материалов. В связи с этим, важное значение придается воздействию различных факторов (химических, физических), способных регулировать деструктивную активность грибов. В последнее время в качестве таких факторов используются низкоинтенсивное электромагнитное излучение. В связи с этим нами исследовалось действие электромагнитного излучения в виде слабого импульсного магнитного поля (ИМП) и низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на рост и активность экзооксидоредуктаз (каталазы, пероксидазы) ряда мицелиальных грибов – деструкторов промышленных материалов. Объектами исследования являлись микроскопические грибы, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов: *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*. Для создания слабого низкочастотного ИМП использовали источник VL 2 (пачки по 20 импульсов длительностью 227 мкс с амплитудой магнитной индукции 1.5 мТл, следующие с частотой 15 Гц). Для создания поля применялся генератор фирмы "Electro-Biology Inc". Время экспозиции – 30, 90, 150 и 210 мин. В качестве источника НИЛИ использовался многомодовый полупроводниковый InGaP/GaAs/InGaAs лазер полоскового типа, изготовленный в НИФТИ ННГУ. Режим работы лазера непрерывный, длина волны генерации 980 нм. Изучалось воздей-

ствие лазера на двух показателях мощности – 0.3 Вт и 0.7 Вт. Время экспозиции – 5 и 10 мин. Установлено, что исследованные факторы по-разному действуют на споры и вегетативный мицелий грибов. Так под воздействием НИЛИ в ряде случаев имел место ингибирующий эффект на линейную скорость роста (воздействие на споры) *A. niger* (0.3 Вт, 5 мин; 0.3 Вт, 10 мин; 0.7 Вт, 5 мин) и *P. cyclospium* (0.3 Вт, 5 мин; 0.7 Вт, 10 мин). При этом накопление биомассы (воздействие на мицелий) *A. niger* снижалось только при воздействии 0.3 Вт, 5 мин и 0.7 Вт, 10 мин; а *P. cyclospium* - при 0.7 Вт, 10 мин. У *Alt. alternata* практически не наблюдалось изменений скорости роста, но имело место снижение накопления биомассы при всех вариантах воздействия. Действие ИМП приводило к незначительному ингибированию линейной скорости роста грибов *A. niger* и *Alt. alternata*, при этом имело неоднозначный эффект на прирост их биомассы. Для гриба *P. cyclospium* наблюдалось увеличение линейной скорости роста при экспозиции 90 и 150 мин, но имело место снижение прироста биомассы относительно контроля во всех вариантах опыта. Неоднозначный эффект данные физические факторы оказывали и на активность экзооксидоредуктаз грибов. Так, ИМП практически не оказывало влияние на активность каталазы и пероксидазы *A. niger*, а под воздействием НИЛИ активность пероксидазы *A. niger* и *Alt. alternata* ингибировалась во всех вариантах опыта. В ряде случаев отмечен дозозависимый эффект: с увеличением мощности и времени воздействия НИЛИ активность каталазы *P. cyclospium* снижалась и возрастала у *A. niger*, а с увеличением времени воздействия ИМП активность каталазы увеличивалась у *Alt. alternata* и снижалась у *P. cyclospium*, активность пероксидазы *P. cyclospium* увеличивалась. Неоднозначность результатов может быть связана как с природой и интенсивностью воздействия исследованных физических факторов, так и физиолого-биохимическими особенностями данных микромицет.

UDK 579.22

## EFFECT OF WEAK LOW-FREQUENCY PULSED MAGNETIC FIELD AND LOW LEVEL LASER RADIATION ON GROWTH AND OXIDOREDUCTASE ACTIVITY OF FUNGI – ACTIVE DECOMPOSERS OF POLIMERIC MATERIALS

Makarov I.O., Kluev D.A., Smirnov V.F., Smirnova O.N., Anikina N.A., Zaharova E.A., Iakovleva A.A.

National Research University Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Nizhniy Novgorod, Russia  
 603950, Nizhniy Novgorod, Prospekt Gagarina, 23, building 5, e-mail: biodeg@mail.ru

It was shown that weak low-frequency pulsed magnetic field and low-level laser radiation has ambiguous action on growth and oxidoreductase activity of fungi – active decomposers of polymeric materials. Dose-rate dependence of these factors towards fungal catalase and peroxidase was noticed.

**Key words:** fungi; weak low-frequency pulsed magnetic field; low-level laser radiation; catalase; peroxidase

It is well known that fungi have systems of highly active enzymes, providing various chemical transformations of complex substrates of different origin. Research devoted to increasing fungal destructive activity is particularly topical in developing technologies connected to industrial waste utilization. Contrariwise the suppression of the destructive activity of micromycetes is of great significance in the field of preventing biodeterioration processes of industrial materials. In this regard the actions of different factors (chemical, physical), that are able to regulate fungal destructive activity attach great importance. Lately low level electromagnetic radiation is used as such a factor. Therefore we have investigated the effect of electromagnetic radiation in the form of pulsed magnetic field and low-level laser radiation on growth and exo oxidoreductase (catalase, peroxidase) activity of a number of fungi – decomposers of industrial materials. Fungi obtained from All-Russian collection of microorganisms: *Penicillium cyclospium*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* were chosen as test objects. To create pulsed magnetic field the source VL 2 (the group of 20 pulses with 227 mcs duration with 1.5 mTl magnetic induction amplitude incoming with a frequency of 20 Hz). The generator of the company “Electro-Biology Inc” was used to create the field. Time of exposure was 30, 90, 150 and 210 minutes. A multimodal stripe-geometry semiconductor InGaP/GaAs/InGaAs laser produced in NIPTI NNGU was used as the source of low level laser radiation. Laser performance is continual, generation wave length is 980 nm. Power ratings of 0.3 W and 0.7 W were used to study laser action. Time of exposure was 5 and 10 minutes. It was found that given factors act differently on fungal spores and vegetative mycelium. For instance in some cases the low level laser radiation inhibit the linear growth rate (effect on spores) of *A. niger* (0.3 W, 5 minutes; 0.3 W, 10 minutes; 0.7 W, 5 minutes) and *P. cyclospium* (0.3 W, 5 minutes; 0.7 W, 10 minutes). However biomass growth (effect on mycelium) of *A. niger* only decreases under 0.3 W, 5 minutes and 0.7 W, 10 minutes treatment; and *P. cyclospium* - under 0.7 W, 10 minutes treatment. The changes in *Alt. alternata* growth

rate was not observed, but there was the decrease of biomass accumulation under all used actions. The action of pulsed magnetic field causes little inhibition of linear growth rate of *A. niger* and *Alt. alternata*, while its effect on biomass growth was ambiguous. In the case of *P. cyclopium* the increase of linear growth rate under 90 and 150 minutes exposure time was noticed, while the decrease in biomass growth comparing to control was shown in all variants of the experiment. The effect of the given physical factors on fungal exo oxidoreductase was also ambivalent. For example, pulsed magnetic field had almost no effect on *A. niger* catalase and peroxidase activity, and there was the inhibition of the peroxidase activity of *A. niger* and *Alt. alternata* under low level laser radiation treatment in all variant of the experiment. In some cases dose-dependent effect was found. Increasing power and exposure time of low level laser radiation results in the decrease of *P. cyclopium* catalase activity and the growth of *A. niger* catalase activity. Pulsed magnetic field exposure time increment causes the increase of *Alt. alternata* catalase activity and the decrease of *P. cyclopium* catalase activity, while *P. cyclopium* peroxidase activity rises. The ambiguity of results can be associated with nature and level of the effects of studied physical factors as well as with physiological and biochemical features of the fungi.

УДК: 543.9:57.044

## **ЗОЛЬ-ГЕЛЬ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ СИЛАНОВЫХ ПРЕКУРСОРОВ, ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА И МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ПЛЕНОК**

**О. А. Каманина**

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Россия, 300041, Tula, пр. Ленина, 92, о.а.kamanina@gmail.com, +79534194848

В работе синтезировали органосиликатные материалы на основе силановых прекурсоров при использовании структуроуправляющего агента ПВС. Показали, что в условиях золь-гель синтеза при использовании дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 формируются биогбриды структуры «клетка в оболочке».

**Ключевые слова:** золь-гель метод, ПЭГ, ПВС, инкапсулирование клеток, биокатализ, биосенсор

В настоящее время особый интерес представляет получение гибридных биоматериалов, полученных с использованием методов золь-гель химии. В последние годы с развитием методов нанотехнологий и биотехнологий появилось новое направление исследований по получению «живых» гибридных материалов, в которых клетки иммобилизованы в органомодифицированные силикагели. Ранее в нашем научном коллективе было показано, что дрожжевые клетки участвуют в самоорганизованном формировании архитектуры гибридного материала, и в определенных условиях образуется структура «клетки в оболочке». Однако пока выявлены не все критические параметры и условия для направленного формирования таких структур. При использовании поливинилового спирта (ПВС), как структуроуправляющего агента в золь-гель синтезе гибридных материалов, возможно образование органосиликатных пленок благодаря способности ПВС формировать гидрогели. Однако оставалось неизвестным, возможно ли образование оболочки вокруг клеток в этих условиях. Синтез гибридных материалов проводили на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482.

Полученные гибридные биоматериалы изучали методами ИК-спектроскопии, оптическом и сканирующей электронной микроскопии. Так в работе показали, что в условиях золь-гель синтеза из клеток *Debaryomyces hansenii*, силановых прекурсоров и ПВС формируются пленки со структурой «клетки в оболочке».

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке РФФИ № 16-43-710183

UDC 543.9:57.044

## **SOL-GEL MATERIALS BASED ON SILANE PRECURSORS, POLYVINYL ALCOHOL AND MICROORGANISMS FOR OBTAINING BIOLOGICAL FILMS**

**O.Kamanina**

Tula state university, Россия, 300041, Tula, pr. Lenina, 92

In this work, organosilicate materials based on yeast cells *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482, as sol-gel reaction centers, and silane precursors using a PVA structurally directed agent were synthesized and investigated. It was shown that under the conditions of sol-gel synthesis cells *Debaryomyces hansenii*, silane precursors and PVA form



films with the "cell-in-shell" structure.

**Key words:** sol-gel, PEG, PVA, encapsulated cells, biocatalyst, biosensor

At present, special interest is in obtaining hybrid biomaterials obtained using sol-gel chemistry methods. In recent years, with the development of methods of nanotechnology and biotechnology, a new line of research has emerged for the production of "live" hybrid materials, in which the cells are immobilized into organomodified silica gels. Earlier in our scientific team it was shown that yeast cells participate in the self-organized formation of the architecture of a hybrid material, and under certain conditions a "cell-in-shell" structure is formed. However, not all critical parameters and conditions for the directed formation of such structures have been identified so far. When polyvinyl alcohol (PVA) is used as a structuring agent in the sol-gel synthesis of hybrid materials, the formation of organosilicate films is possible due to the ability of PVA to form hydrogels. However, it remained unknown whether it was possible to form a shell around the cells under these conditions. Synthesis of hybrid materials was carried out on the basis of the yeast *Debaryomyces hansenii* BKM Y-2482.

The obtained hybrid biomaterials were studied by IR spectroscopy, optical and scanning electron microscopy. So in the work showed that under conditions of sol-gel synthesis from the cells *Debaryomyces hansenii*, silane precursors and PVA, films with a "cell-in-shell" structure are formed.

**Grant:** The reported study was funded by Russian Foundation for Basic Research according to the research project №16-43-710183

УДК: 622.342.1

## ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ РОСТА ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ БИОВСКРЫТИЯ ХВОСТОВ ОБОГАЩЕНИЯ

Д.Р.Магомедов, А.К.Койжанова, Э.М.Камалов, М.Б.Ерденова, Ж.Д.Жанабай

АО «Институт металлургии и обогащения», Республика Казахстан, 050010, Алматы, ул. Шевченко, 29/133, davidmag16@mail.ru, Тел.: +7-727-298-45-02, факс +7-727-298-45-03

Внедрение бактериального выщелачивания, как и других гидromеталлургических способов добычи металлов, имеет большое экономическое значение, обеспечивает более полное использование минерального сырья и благоприятно для охраны окружающей среды. Установлено, прямое влияние динамики роста клеток на активное окисление железа, что в свою очередь играет немаловажную роль в процессе биовскрытия и извлечения остаточного золота из техногенных отходов.

**Ключевые слова:** хемолитотрофы, биоокисление, хвосты обогащения, динамика роста клеток, окисление железа.

Необходимость применения бактериального выщелачивания для извлечения золота, а также и меди из забалансовых руд [1], возникает в результате образования техногенных месторождений отвалного типа с трудноизвлекаемыми классами минералов [2-4]. Это требует перехода к инновационным процессам и аппаратам, новой экологически чистой технологии, обеспечивающей извлечение весьма тонких классов металлов [5,6]. В данный момент использование достижений в области биовыщелачивания и биовскрытия, в процессе которых используются промышленно-ценные штаммы микроорганизмов для извлечения золота и сопутствующих металлов из техногенного сырья, является наиболее приемлемой и менее затратной [7-8].

Для изучения физиологических свойств бактерий в процессе биовскрытия хвостов флотации были использованы различные штаммы бактерий *A.Ferrooxidans*, выделенные из исходной руды Васильковского месторождения - штамм 1, отвалов кучного выщелачивания того же месторождения - штамм 2 и лабораторный штамм - штамм 3. В процессе биовскрытия параллельно изучались биологические свойства этих штаммов, которые непосредственно определяют активность исследуемых штаммов: изменения pH среды, плотность клеток, окислительные свойства (окисление Fe<sup>2+</sup> до Fe<sup>3+</sup>). Все три культуры были культивированы на синтетической среде 9К (Сильвермана и Люндгрена).

В результате опытов установлено, что наиболее активным был штамм 1, где активное окисление двухвалентного железа наблюдается с первых же суток, концентрация которого с 8,0 г/дм<sup>3</sup> до 0,05 г/дм<sup>3</sup>. В остальных штаммах этот показатель был равен: штамм 2 – 0,3 г/дм<sup>3</sup> и штамм 3 – 1,9 г/дм<sup>3</sup>. По степени

окисления железа можно судить, что наиболее активным является штамм 1, так как этот показатель является одним из преимущественных факторов при вскрытии золотосодержащих минералов из трудно-скрываемых упорных отходов.

В процессе биовскрытия уменьшение плотности клеток у штаммов 1 и 2 составляет всего лишь 15,4-40%, остаточная концентрация клеток в биорастворе составляет 84,6 % - у штамма 1, и 60 % у штамма 2, что указывает на резистентность данных штаммов к исследуемому субстрату. У лабораторного штамма 3 плотность клеток резко уменьшается уже после первых суток контакта с хвостами флотации. При уменьшении концентрации клеток процессе вскрытия трудноупорных минералов и их кристаллических решеток проходит в очень медленном темпе, что в последующем отрицательно влияет на процесс выщелачивания золота. Там, где не происходит резких колебаний концентрации клеток процесс окисления железа идет активно и процесс разрушения кристаллических решеток, где ассоциировано золото, осуществляется намного интенсивнее. Это свойство характерно для активных штаммов, таких как в наших опытах – штаммы 1 и 2. Если сравнить по активности клеток и интенсивности окисления железа, то штамм 3 (лабораторный штамм) проявил меньшую активность в процессе вскрытия минералов из хвостов флотации, что указывает на неэффективность использования данного штамма для биовскрытия хвостов флотации. При микроскопировании также были обнаружены цельные клетки, без каких либо морфологических изменений.

В результате проведенных опытов по биоокислению установлено, что наиболее активным среди исследованных культур является штамм 1, выделенный из руды Васильковского месторождения, который показал быструю адаптивность к исследуемому объекту (хвосты флотации) по всем параметрам. Исходя из этого, можно сделать вывод: так как хвосты флотации по происхождению относятся к техногенным отходам данного месторождения то для эффективного извлечения золота в последующем цианировании приемлемым является использование штамма 1 при проведении предварительного биовскрытия.

В процессе биоокисления в растворе обнаружено изменение концентрации сопутствующих металлов переходящих в раствор благодаря деятельности тионовых бактерий. Это свидетельствует об активной деятельности данных микроорганизмов, и обнаруженные клетки в растворах после биоокисления также подтверждают их адаптацию к хвостам флотации.

В процессе биовскрытия хвостов изучены биологические свойства трех штаммов бактериальных культур *A. Ferrooxidans* – выделенных из исходной руды Васильковского месторождения (штамм 1), из отвалов того же месторождения (штамм 2) и лабораторный (штамм 3). Установлено прямое влияние динамики роста клеток на активное окисление железа в процессе биовскрытия хвостов. Определено, что окислительные свойства штаммов в достаточной степени отличаются между собой. Наибольшую активность из них проявил штамм 1. Показано, что бактериальные клетки штамма 1, с учетом того, что они являются аборигенными обитателями данного месторождения, быстро адаптируются к условиям биовскрытия и процесс происходит немного интенсивнее по сравнению с использованием других штаммов.

#### Литература:

1. Чантурия В.А. Основные направления комплексной переработки минерального сырья // Горный журнал. – 1995. - № 1. – С. 50-54.
2. Кармазин В.В., Рыбакова О.И., Измалков В.А., Татауров С.Б. Новые процессы извлечения мелкого золота из отвальных продуктов // Горный журнал. – 2002. - №2, - С. 76-82.
3. Рыбакова О.И. Основные принципы построения комбинированных технологических схем доизвлечения тонкого золота из отвальных продуктов // Горный информационно-аналитический бюллетень. – 2003. - №10. – С. 75-79.
4. Холматов М.М., Калинин В.П. Проблемы переработки техногенных отходов // Горный вестник Узбекистана. 2003. № 4. С. 10-11.
5. Tuovinen O.H., Kelly D.P. Biology of *Th. Ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulfide ores // Z.Allg. Microbiol. 1972. V. 12. № 4. P. 311-396.
6. Рудой Г.Н., Волкова Н.А., Шадрунова И.В., Зелинская И.В. Технологические, экономические и экологические аспекты переработки техногенного сырья горно-металлургических предприятий / Материалы Международного совещания «Новые технологии обогащения и комплексной переработки труднообогатимого природного и техногенного минерального сырья» (Плаксинские чтения – 2011, Россия, г. Верхняя Пышма), 19-24 сентября 2011. – С.6-12.
7. Бочаров З.В. Игнаткина В.А., Абрютин Д.В. Технология переработки золотосодержащего сырья. – М.: Изд. Дом МИСиС, 2011, 328 с.
8. Канаев А.Т., Канаева З.К., Мырзаханова И.А., Уразбекова Г.Е., Сатыбалдиева Г.К., Мусаев К.Л. Глубокое извлечение золота из хвостов обогащения месторождения Акбакай культурой *Acidithiobacillus ferrooxidans* // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 6. – С. 115-120.

**Финансирование:** Грантовое финансирование из бюджета

UDC 622.342.1

## RESEARCHING OF THE PHYSIOLOGY OF THE GROWTH OF HEMOLITHOTROPHIC MICROORGANISMS IN THE PROCESS OF BIO-DISSECTION OF TAILS OF BENEFICATION

D.Magomedov, A.Koizhanova, E.Kamalov, M.Erdenova, Z.Zhanabai

JSC "Institute of Metallurgy and Ore Benefication", Republic of Kazakhstan, 050010, Almaty, Shevchenko street, 29/133

The introduction of bacterial leaching, as well as other hydrometallurgical methods of mining metals, is of great economic importance, provides a more complete use of mineral raw materials and is favorable for environmental protection. The direct influence of the dynamics of cell growth on the active oxidation of iron is established, which in turn plays an important role in the process of biovection and recovery of residual gold from man-made waste.

**Key words:** chemolithotrophs, biooxidation, tailings of enrichment, dynamics of cell growth, oxidation of iron.

The need to use bacterial leaching to extract gold, as well as copper from off-balance ores [1], arises as a result of the formation of man-caused deposits of a dump type with hard-to-recover classes of minerals [2-4]. This requires a transition to innovative processes and devices, a new environmentally friendly technology that ensures the extraction of very fine classes of metals [5,6]. At the moment, the use of advances in bioleaching and biosection, in the process of which industrially valuable strains of microorganisms are used to extract gold and associated metals from technogenic raw materials, is the most acceptable and less expensive [7-8].

To research the physiological properties of bacteria during the biovection of tails of flotation, various strains of A.Ferrooxidans bacteria isolated from the initial ore of the Vasilkovsky deposit - strain 1, heap leaching dumps of the same deposit - strain 2 and laboratory strain - strain 3 were used. In the biovection process, biological properties of these strains, which directly determine the activity of the strains studied: changes in the pH of the medium, cell density, oxidizing properties (oxidation of Fe<sup>2+</sup> to Fe<sup>3+</sup>). All three cultures were cultivated on synthetic medium 9K (Silverman and Lundgren).

As a result of the experiments it was found that the most active strain was 1, where the active oxidation of bivalent iron was observed from the first day, the concentration of which was from 8.0 g / dm<sup>3</sup> to 0.05 g / dm<sup>3</sup>. In the remaining strains this indicator was equal to: strain 2 - 0.3 g / dm<sup>3</sup> and strain 3 - 1.9 g / dm<sup>3</sup>. According to the degree of oxidation of iron, it can be judged that strain 1 is the most active, since this indicator is one of the most important factors in the dissection of gold-bearing minerals from difficult-to-open resistant wastes.

In the biovection process, the cell density decrease in strains 1 and 2 is only 15.4-40%, the residual cell concentration in the bioresorb is 84.6% in strain 1 and 60% in strain 2, which indicates the resistance of these strains to studied substrate. In laboratory strain 3, the cell density decreases sharply after the first day of contact with flotation tailings. With a decrease in cell concentration, the process of dissecting difficult-to-refractory minerals and their crystal lattices proceeds at a very slow rate, which subsequently negatively affects the process of leaching of gold. Where there is no abrupt fluctuation in the concentration of cells, the process of oxidation of iron is active and the process of destruction of crystal lattices where gold is associated is much more intense. This property is characteristic of active strains, such as strains 1 and 2 in our experiments. If compared with the activity of cells and the intensity of iron oxidation, strain 3 (laboratory strain) showed less activity in the process of opening minerals from tailings of flotation, which indicates efficiency of using this strain for biovection of flotation tailings. At microscopy, whole cells were also found, without any morphological changes.

As a result of carried out experiments on biooxidation, it was established that the most active among the cultures studied was strain 1 isolated from the Vasilkovsky ore, which showed rapid adaptability to the object under study (flotation tailings) in all parameters. Proceeding from this, it is possible to draw a conclusion: since tailings of flotation by origin are related to man-caused waste of this deposit, then for the effective gold recovery in subsequent cyanidation, it is acceptable to use strain 1 in the preliminary biovection.

In the process of biooxidation in solution, a change in the concentration of the accompanying metals passing into the solution was observed due to the activity of thio bacteria. This indicates the active activity of these microorganisms, and the detected cells in solutions after biooxidation also confirm their adaptation to the tailings of flotation.

In process of tailings biovection examined Biological properties of three strains of A. Ferrooxidans bacterial cultures isolated from the original ore of the Vasilkovskoye deposit (strain 1), from the dumps of the same deposit (strain 2) and laboratory (strain 3). Direct influence of the growth dynamics of cells on the active oxidation of iron

in the process of tail biovection was established. It is determined that the oxidative properties of the strains differ sufficiently between each other. The most active of them showed strain 1. It is shown that bacterial cells of strain 1, taking into account that they are aboriginal inhabitants of this deposit, quickly adapt to the conditions of biovection and the process occurs a little more intensively than using other strains.

*References:*

1. Chanturia V.A. The main directions of complex processing of mineral raw materials // Mining magazine. - 1995. - No. 1. - P. 50-54.
2. Karmazin VV, Rybakova OI, Izmalkov VA, Tataurov S.B. New processes of extracting small gold from dump products // Mining magazine. - 2002. - № 2, - P. 76-82.
3. Rybakova O.I. Basic principles of construction of combined technological schemes for extracting fine gold from dump products // Mining Information and Analysis Bulletin. - 2003. - №10. - P.75-79.
4. MM Holmatov, V.P. Kalinin. Problems of processing technogenic wastes // Gorny Vestnik of Uzbekistan. 2003. № 4. P. 10-11.
5. Tuovinen O.H., Kelly D.P. Biology of Th. Ferrooxidans in relation to the microbiological leaching of sulfide deeres // Z.Allg. Micriobiol. 1972. V. 12. No. 4. P. 311-396.
6. Rudoy GN, Volkova NA, Shadrinova IV, Zelinskaya IV Technological, economic and ecological aspects of processing technogenic raw materials of mining and metallurgical enterprises / Materials of the International meeting "New technologies of enrichment and complex processing of hard-enriching natural and technogenic mineral raw materials" (Plaksin Readings - 2011, Russia, Verkhnyaya Pyshma), September 19-24, 2011 - C.6-12.
7. Bocharov S. V Ignatkina VA, Abryutin DV Technology of processing of gold-bearing raw materials. - Moscow: Izd. House MISiS, 2011, 328 with.
8. Kanaev AT, Kanaeva ZK, Myrzakhanova IA, Urazbekova GE, SatybaldievaG.K., Musaev KL Deep gold recovery from the tailings of the Akbakai deposit enrichment with the culture of Aciditobacillus ferrooxidans // Progresses of modern natural science. - 2013. - No. 6. - P. 115-120.

**Grant:** Grant financing from the budget

УДК 579.66:663.18

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОМАССЫ *LACTOBACILLUS PARACASEI* В ГЕЛЕВЫХ МАТРИЦАХ НА ОСНОВЕ КОВАЛЕНТНО-СШИТЫХ ПОЛИМЕРОВ

Шустов М. Д., Галеева Ю. С., Белодед А. В., Кузнецов А. Е.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
125047, Москва, Миусская пл., д.9  
e-mail: shustoffmax@yandex.ru

В работе исследовалось сбраживание углеводных субстратов в молочную кислоту клетками *Lactobacillus paracasei*, иммобилизованными в полиакриламидном геле и в гидрогеле поливинилового спирта, модифицированного глицидилметакрилатом. Была изучена возможность использования иммобилизованного биокатализатора в биореакторе при реализации циклического отъемно-доливного процесса ферментации.

**Ключевые слова:** иммобилизованный биокатализатор, *Lactobacillus paracasei*, молочная кислота, поперечно-сшитый поливиниловый спирт, полиакриламидный гель.

Биотехнологический способ получения молочной кислоты обладает рядом преимуществ перед химическим синтезом, в частности, он позволяет получать L-изомер молочной кислоты. Однако процесс периодической ферментации характеризуется низкой продуктивностью. Кроме того, культуры молочнокислых бактерий (основных промышленных продуцентов) требуют дополнительных компонентов питательной среды – источников азота и факторов роста, которые расходуются на наращивание биомассы. Основными преимуществами использования в биотехнологических процессах иммобилизованных клеток являются возможность многократного использования биомассы, упрощение выделения целевого продукта, повышение устойчивости клеток к внешним воздействиям, а также реализация непрерывного и/или циклического высокопродуктивного ферментационного процесса.

В качестве полимера-носителя использовались гидрогели поперечно-сшитого модифицированного глицидилметакрилатом поливинилового спирта (мПВС), а также полиакриламида (ПААГ). Для иммобилизации использовались 24-часовые культуры клеток *L. paracasei*, выращенные на среде Man-Rogosa-Sharpe (MRS). Влажную биомассу, отделённую от культуральной жидкости и отмытую от продуктов метаболизма, смешивали с растворами мономеров и добавляли вещества-инициаторы полимеризации. Из полученного геля формировали гранулы или блоки биокатализатора, которые промывали стерильным физиологическим раствором для удаления неполимеризовавшихся реагентов, а также клеток, не включившихся в полимерную матрицу. Полученный биокатализатор использовали для сбраживания растворов глюкозы в

молочную кислоту. Для проведения ферментации использовали лабораторный биореактор объёмом 500 мл с магнитным перемешивающим устройством. В ходе ферментации в биореакторе поддерживались температура 37 °C и pH 6,8-7,2. Эксперименты со свободными клетками проводили в аналогичных условиях, используя равные количества отмытой биомассы.

В ходе проведенных экспериментов показано, что при иммобилизации активность клеток несколько снижается по сравнению с культурой в свободном виде, причем клетки *L. paracasei*, иммобилизованные в ПААГ, осуществляют брожение с большей скоростью, чем клетки, иммобилизованные в гидрогеле мПВС, демонстрируя тем самым лучшую жизнеспособность в ПААГ.

При проведении циклического отъемно-доливного процесса ферментации с иммобилизованными клетками происходило практически полное сбраживание субстрата в молочную кислоту. При этом снижения скорости образования молочной кислоты (продуктивности) не наблюдалось, гранулы иммобилизованного биокатализатора сохраняли свою целостность, однако через несколько циклов отъема-долива обнаруживалось значительное помутнение среды вследствие развития клеток вне гранул. Таким образом, биомассу *L. paracasei*, иммобилизованную в ПААГ, возможно использовать для проведения продолжительного циклического ферментационного процесса, однако для предотвращения эффекта размножения клеток вне гранул биокатализатора необходима дальнейшая оптимизация процессов иммобилизации и ферментации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №16-19-10469.

UDC 579.66:663.18

## IMMOBILIZATION OF LACTOBACILLUS PARACASEI BIOMASS IN COVALENT-LINKED POLYMER BASED GEL MATRIX.

Shustov M. D., Galeeva J. S., Beloded A. V., Kuznetsov A. E.

*D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia*  
 e-mail: shustoffmax@yandex.ru

In this work we investigated carbohydrate substrates fermentation to lactic acid with *Lactobacillus paracasei* cells immobilized in polyacrylamide gel and in hydrogel of polyvinyl alcohol modified with glycidyl methacrylate. The possibility of the use of the immobilized biocatalyst in a bioreactor in course of semicontinuous fed-batch fermentation process was studied.

**Key words:** immobilized biocatalyst, *Lactobacillus paracasei*, lactic acid, cross-linked polyvinyl alcohol, polyacrylamide gel.

Biotechnological way of lactic acid production has multiple advantages in comparison to chemical synthesis, in particular, it allows to obtain L-isomer of lactic acid. However, periodical fermentation process has low productivity. Besides that lactic acid bacteria cultures (main industrial producer microorganisms) need additional nutrient components – nitrogen sources and growth factors, which are consumed for the biomass growth. The main advantages of immobilized cells use in biotechnological processes are the simplification of the product separation, the increase of cells resistance to outer inactivating impacts and the opportunity to carry out continuous or/and cyclic high-productivity process.

Polyvinyl alcohol modified with glycidyl methacrylate (mPVA) and polyacrylamide gel (PAAG) were used as carrier polymers. 24-hour cultures of *Lactobacillus paracasei*, grown on Man-Rogosa-Sharpe (MRS) nutrient medium were used for immobilization. Wet biomass, separated from culture medium and washed of metabolites was mixed with monomer solutions, and polymerization initiating chemicals were added. Granules or blocks of immobilized biocatalyst were formed from the obtained gel and washed with sterile physiological solution to remove the rest of the reagents and cells not included in the polymer matrix. The obtained biocatalyst was used for glucose fermentation to lactic acid. To carry out the fermentation, we used 500 ml laboratory bioreactor with magnetic stirrer. The temperature of 37°C and pH 6,8-7,2 were maintained in the bioreactor during the fermentation. Experiments with free cells were carried out in similar conditions, using the same quantities of washed biomass.

In the course the experiments, it was stated that the activity of immobilized culture decreases in some extent during the immobilization process in comparison to free culture. *L. paracasei* cells immobilized in PAAG perform the fermentation faster than the cells immobilized in mPVA hydrogel, demonstrating better viability in PAAG.

During semicontinuous fed-batch fermentation process using immobilized cells almost complete substrate conversion into lactic acid took place. Lactic acid production speed and the productivity did not decrease, immobilized

biocatalyst granules kept their integrity, although after several cycles of semicontinuous fed-batch fermentation significant culture medium turbidity was detected due to cells growth outside the granules. Thus, *L. paracasei* biomass immobilized in PAAG can be used for a continuous cyclic fermentation process though to prevent the effect of cells growth outside the granules of immobilized biocatalyst further optimization of immobilization and fermentation processes is necessary.

The present study was sponsored by the Russian Science Foundation (Project # 16-19-10469).

УДК 579.222.2

## **ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНЫХ РЕСУРСОВ ПЕРЕРАБОТКИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ.**

**Ха Т.З., Хусаинов И.А., Канарская З.А., Канарский А.В.**

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВО «КНИТУ»), Казань, Россия, 420015, Казань, ул. Л. Толстого, д.8  
e-mail: fortes16@yandex.ru*

Показана целесообразность сочетания химической и ферментативной обработки вторичных ресурсов переработки растительного сырья для получения питательных сред. В качестве ферментных препаратов использованы целлюлолитические ферментные препараты. Установлена возможность культивирования на полученных питательных средах бактерий и дрожжей, синтезирующих внеклеточные полисахариды.

**Ключевые слова:** рисовая шелуха, кукурузная биомасса, щелочная, перекисная, ферментативная обработки, питательные среды

В биотехнологии актуальными задачами при культивировании микроорганизмов являются повышение выхода биомассы и снижение себестоимости биопродуктов, в том числе за счет применения более дешевых источников сырья. В этой связи перспективным сырьем являются вторичные ресурсы, которые образуются при переработке растительного сырья, которые являются как источниками углерода, так и биогенных веществ. Однако, вторичные ресурсы переработки растительного сырья имеют структурные свойства и содержат вещества, которые препятствуют эффективному усвоению углеводов.

Целью нашей работы является получение питательных сред из рисовой шелухи и лигноцеллюлозной биомассы кукурузы для культивирования микроорганизмов.

Для достижения данной цели указанного сырья обрабатывалось химическими и биокаталитическими методами.

Установлена целесообразность предварительной обработки рисовой шелухи щелочью концентрацией 10% при температуре 115 °С в течении 40 мин и гидромодуле 8:1. В этих условиях

Происходит растворение кремнезема и лигнина в рисовой шелухе. Последующая промывка позволяет отделить растворенный кремнезем и лигнин от клетчатки, которая в последующем эффективно гидролизуеться целлюлолитическими ферментами.

Другим перспективным и доступным сырьем является лигноцеллюлозная биомасса кукурузы, включающая все части растения как при силосовании в процессе заготовки кормов, так и без початков при заготовке их на зерно. Как и все травянистые культуры, кукуруза имеет отличительное строение клеточной стенки, а также наличие фенольных соединений в структуре полисахаридов клетчатки. С целью предварительной деструкции растительной биомассы прекрасно зарекомендовал себя метод низкотемпературной щелочной (гидроксид натрия) и перекисно-щелочной обработки. Полученная таким образом клетчатка, легко подвергалась глубокому ферментативному гидролизу (около 80% конверсия). Получаемый ферментализат содержит до 3% редуцирующих веществ. Избытки щелочи не создают экологических проблем, так как при нейтрализации уксусной кислотой образуют ацетатный буфер, который имеет чрезвычайно важное значение для регулирования уровня pH при последующем культивировании микроорганизмов. Кроме того, натрий в его ацетатной форме имеет высокую степень усвоения, играя большую роль в мембранных процессах клетки микроорганизмов.

Полученные ферментализаты из клетчатки рисовой шелухи и биомассы кукурузы использованы для получения питательных сред при культивировании дрожжей и бактерий, синтезирующих внеклеточные полисахариды.

UDC 579.222.2

## INTENSIFICATION OF BIOCATALYTIC METHODS OF OBTAINING NUTRIENT MEDIA FOR CULTIVATION OF MICROORGANISMS ON THE BASIS OF SECONDARY RESOURCES OF PROCESSING PLANT RAW MATERIALS.

На Т.З., Khusainov I. A., Kanarskaya Z.A., Kanarskiy A.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kazan National Research Technological University» («KNRTU») Kazan, Russia,  
 420015, Kazan, L. Tolstoy st. 8  
 e-mail: fortes16@yandex.ru

The expediency of combining chemical and enzymatic treatment of secondary resources of processing of plant raw materials for obtaining nutrient media is shown. Cellulolytic enzyme preparations were used as enzymatic preparations. The possibility of cultivation of bacteria and yeast synthesizing extracellular polysaccharides on the nutrient media was established.

**Key words:** rice husk, corn biomass, alkaline, peroxide, enzymatic treatments, nutrient media

In biotechnology, the actual tasks in the cultivation of microorganisms are to increase the yield of biomass and reduce the cost of bio-products, including through the use of cheaper sources of raw materials. In this regard, the prospective raw materials are secondary resources that are formed during the processing of plant raw materials, which are both sources of carbon and nutrients. However, the secondary resources of processing raw materials have structural properties and contain substances that interfere with the effective absorption of carbohydrates.

The aim of our work is to obtain nutrient media from rice husk and lignocellulose corn biomass for the cultivation of microorganisms.

To achieve this goal, this raw material was treated with chemical and biocatalytic methods.

The expediency of preliminary processing of rice husk with alkali concentration of 10% at a temperature of 115 ° C for 40 minutes and a hydromodule of 8: 1 was established. In these conditions

There is a dissolution of silica and lignin in the rice husks. Subsequent washing allows separation of dissolved silica and lignin from the fiber, which is subsequently effectively hydrolyzed by cellulolytic enzymes.

Another promising and affordable raw material is lignocellulosic corn biomass, which includes all parts of the plant both during siloing in the process of harvesting feeds, and without cobs when harvesting them for grain. Like all herbaceous crops, corn has a distinctive structure of the cell wall, as well as the presence of phenolic compounds in the structure of polysaccharides of cellulose. For the purpose of preliminary destruction of plant biomass, the method of low-temperature alkaline (sodium hydroxide) and peroxide-alkaline treatment has proven itself. The fiber thus obtained was easily subjected to deep enzymatic hydrolysis (about 80% conversion). The resulting fermentalitate contains up to 3% of reducing agents. Excess alkali does not create environmental problems, as neutralization with acetic acid forms an acetate buffer, which is extremely important for controlling the pH level during the subsequent cultivation of microorganisms. In addition, sodium in its acetate form has a high degree of assimilation, playing a big role in the membrane processes of the microorganism cell.

The resulting enzymes from fiber husk and corn biomass were used to produce nutrient media for the cultivation of yeasts and bacteria synthesizing extracellular polysaccharides.

УДК 579.6; 577.2;

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ PENICILLIUM CANESCENS В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЛАККАЗ TRAMETES HIRSUTA

Савинова О.С., Васина Д.В., Чулкин А.М., Вавилова Е.А., Рожкова А.М., Тяжелова Т.В., Сеницын А.П., Федорова Т.В.

Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук  
 Москва, Россия;  
 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2, savinova\_os@rambler.ru

Показана возможность использования аскомицета *Penicillium canescens* PCA-10(niaD-) для экспрессии изоферментов лакказ базидиомицета *Trametes hirsuta* 072. Экспрессированы гены *lacA*, *lacC*, *lacD*, *lacF* *T. hirsuta* 072.

**Ключевые слова:** *Penicillium canescens*, рекомбинантные изоферменты, лакказы, *Trametes hirsuta*

Лакказы (ЕС 1.10.3.2) - лигнолитические ферменты, относящиеся к классу медьсодержащих оксидаз - широко востребованы в различных отраслях промышленности и используются для предобработки лигноцеллюлозных материалов при производстве бумаги, обесцвечивания синтетических красителей, биоремедиации и др. Лакказы базидиомицетов, в т.ч. рода *Trametes*, являются перспективными объектами, поскольку обладают широкой субстратной специфичностью и высоким окислительно-восстановительным потенциалом.

Известно, что лакказы кодируются в геномах базидиомицетов обширными мультигенными семействами, при этом их изоферменты значительно отличаются по предсказанным свойствам. Однако применение ферментных препаратов лигнолитического действия на основе лакказ в данный момент ограничено двумя факторами: 1) отсутствием всесторонней характеристики всех изоферментов лакказ, особенно минорных; 2) трудностью их промышленного получения в силу отсутствия эффективных природных и рекомбинантных штаммов-продуцентов. Причем в случае рекомбинантных ферментов низкую продукцию целевого белка связывают с нарушениями в посттрансляционных модификациях белка, включения меди в активный центр и фолдинга фермента.

В ходе аннотации генома *Trametes hirsuta* 072 определено, что он содержит семь генов (*lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD*, *lacE*, *lacF*, *lacG*), кодирующих изоферменты лакказ [1], шесть из которых (за исключением *LacA*) являются минорными и их продукция очень низкая или вовсе отсутствует.

Для получения рекомбинантных изоферментов лакказ *T. hirsuta* 072 мы использовали аскомицет *Penicillium canescens*, для которого существует три действующие экспрессионные системы, основанные на использовании промоторов генов, кодирующих ксиланазу А (*xylA*), β-галактозидазу (*bgaS*) и арабинофуранозидазу (*abfA*). Все три промотора обеспечивают индуцибельную экспрессию гидролитических ферментов в клетках гриба, однако, уровни экспрессии белка отличаются (Таблица 1) [2].

Таблица 1. Уровень гетерологичной экспрессии 1,4-β-глюканазы (*eglIII*) и β-глюкозидазы (*bglII*) в реципиентном штамме *Penicillium canescens* Δ*niaD*

Промотор	<i>eglIII Penicillium verruculosum</i>		<i>bglII Aspergillus niger</i>	
	Общее кол-во секретируемого белка, г/л	Содержание целевого белка, %	Общее кол-во секретируемого белка, г/л	Содержание целевого белка, %
<i>xylA</i>	9-10	28	8-10	31
<i>abfA</i>	8-9	19	8-9	15
<i>bgaS</i>	10-11	31	9-10	30

Для экспрессии генов *lacA*, *lacC*, *lacD*, *lacF* *T. hirsuta* 072 в *P. canescens* PCA-10(*niaD*-) был выбран промотор *bgaS* в связи с высоким уровнем экспрессии, а также простой и экономически выгодной схемой культивирования рекомбинантных штаммов. Была показана высокая эффективность транскрипции гена *lacA* у *P. canescens*, выход рекомбинантного фермента (*rLacA*) составлял 10-20 мг/л. [3]. Сравнение 3D структур, а также биохимических и каталитических свойств *LacA* и *rLacA* показало идентичность нативного и рекомбинантного ферментов. Был сделан вывод, что данная система подходит для экспрессии изоферментов лакказ *T. hirsuta*. Гены *lacC*, *lacD* и *lacF* были успешно экспрессированы в этой системе и получены достаточные количества целевых белков для их характеристики.

*Литература:*

1. Pavlov A.R., Tyazhelova T.V., Moiseenko K.V., et al. Draft genome sequence of the fungus *Trametes hirsuta* 072// *Genome Announc.* 2015. Vol. 3 №6. P.1-6.
2. Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M.// *Penicillium canescens* Host as the platform for development of a new recombinant strain producers of carbohydrases, *Microorganisms in Biorefineries.* 2014. Vol. 26. P. 1-19
3. Abyanova A.R., Chulkin A.M., Vavilova E.A., et al. A heterologous production of the *Trametes hirsuta* laccase in the fungus *Penicillium canescens*//*Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. Vol. 46. P. 313–317.

Работа была выполнена при поддержке Министерства науки и образования РФ (Идентификационный номер проекта: RFMEFI61617X0081)



УДК 579.6; 577.2;

## USING OF *PENICILLIUM CANESCENS* AS A SYSTEM FOR EXPRESSION OF *TRAMETES HIRSUTA* LACCASE ISOZYMES

Savinova O.S., Vasina D.V., Chulkin A.M., Vavilova E.A., Rozhkova A.M., Tyazhelova T.V., Sinitsyn A.P., Fedorova T.V.

Bach Institute of Biochemistry, The Research Center of Biotechnology RAS  
 Moscow, Russia;  
 119071, Leninsky prospekt, 33, build. 2, savinova\_os@rambler.ru

The possibility of using Ascomycete *Penicillium canescens* PCA-10 (niaD-) for the expression of laccase isoenzymes of Basidiomycete *Trametes hirsuta* 072 is shown. The *T. hirsuta* 072 genes lacA, lacC, lacD, lacF are expressed.

**Key words:** *Penicillium canescens*, recombinant isoenzymes, laccase, *Trametes hirsuta*

Lacases (EC 1.10.3.2) - lignolytic enzymes belonging to the class of copper-bearing oxidases - are widely demand in various industries and are used for pretreatment of lignocellulosic materials in the production of paper, bleaching of synthetic dyes, bioremediation, etc. Laccase of basidiomycetes, incl. of the genus *Trametes*, are promising objects, since they have broad substrate specificity and high oxidation-reduction potential.

It is known that laccase is encoded in the genomes of basidiomycetes by extensive multigenic families, and their isoenzymes differ significantly in the predicted properties. However, the use of enzyme preparations of lignolytic action based on laccase is currently limited by two factors: 1) the lack of a comprehensive characterization of all isoenzymes of laccase, especially minor; 2) the difficulty of their industrial production due to the lack of effective natural and recombinant producer strains. In the case of recombinant enzymes, the low production of the target protein is associated with impaired post-translational modifications of the protein, the inclusion of copper in the active center, and folding of the enzyme.

During the annotation of the *Trametes hirsuta* 072 genome, was determined that it contains seven genes (lacA, lacB, lacC, lacD, lacE, lacF, lacG) encoding laccase isoenzymes [1], six of which (except LacA) are minor and their products very low or absent.

To obtain recombinant isoenzymes of laccase *T. hirsuta* 072, we used Ascomycete *Penicillium canescens*, for which there are three active expression systems based on the use of promoters of genes encoding xylanase A (xylA),  $\beta$ -galactosidase (bgaS) and arabinofuranosidase (abfA). All three promoters provide inducible expression of hydrolytic enzymes in fungal cells, however, protein expression levels are different (Table 1) [2].

Table 1. Level of heterologous expression of 1,4- $\beta$ -glucanase (eglIII) and  $\beta$ -glucosidase (bglII) in the recipient strain *Penicillium canescens*  $\Delta$ niaD

Promo-ter	eglIII <i>Penicillium verruculosum</i>		bglII <i>Aspergillus niger</i>	
	Total amount of secreted protein, g / l	Target protein content,%	Total amount of secreted protein, g / l	Target protein content,%
xylA	9-10	28	8-10	31
abfA	8-9	19	8-9	15
bgaS	10-11	31	9-10	30

For the expression of the *T. hirsuta* 072 genes lacA, lacC, lacD, lacF in *P. canescens* PCA-10 (niaD-), the bgaS promoter has been selected in connection with the high level of expression, as well as the simple and economically advantageous scheme of the recombinant strains cultivation. High transcription efficiency of the lacA gene in *P. canescens* was shown, the yield of the recombinant enzyme (rLacA) was 10-20 mg/l [3]. Comparison of 3D structures, as well as biochemical and catalytic properties of LacA and rLacA, showed the identity of native and recombinant enzymes. It was concluded that this system is suitable for the expression of laccase isoenzymes of *T. hirsuta*. The genes lacC, lacD and lacF were successfully expressed in this system and sufficient amounts of the target proteins were obtained to characterize them.

### References:

1. Pavlov A.R., Tyazhelova T.V., Moiseenko K.V., et al. Draft genome sequence of the fungus *Trametes hirsuta* 072// *Genome Announc.* 2015. Vol. 3 №6. P.1-6.
2. Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M.// *Penicillium canescens* Host as the platform for development of a new recombinant

*strain producers of carbohydrases, Microorganisms in Biorefineries. 2014. Vol. 26. P. 1-19*  
*3. Abyanova A.R., Chulkin A.M., Vavilova E.A., et al. A heterologous production of the Trametes hirsuta laccase in the fungus Penicillium canescens//Appl. Biochem. Microbiol. 2010. Vol. 46. P. 313–317.*

The work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project identification number: RFMEFI61617X0081)

УДК: 631.417:581.142

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ В КАЧЕСТВЕ ДЕТОКСИЦИРУЮЩИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ИНАКТИВАЦИИ АНТИБИОТИКОВ

М.М.Леонтьева, Е.Д.Дмитриева

Тульский государственный университет, Россия, 300028, Тула, Проспект Ленина, 92, [mani.leontyeva@gmail.com](mailto:mani.leontyeva@gmail.com), +79539581013

Определены количественные характеристики детоксицирующей способности гуминовых веществ торфов по отношению к антибиотикам разных классов. Установлено, что присутствие гуминовых веществ в растворе снижает токсический эффект, оказываемый антибиотиками на рост микроорганизмов.

**Ключевые слова:** гуминовые вещества, коэффициент детоксикации, антибиотики, константа детоксикации

При производстве биосинтетических антибиотиков утилизация мицелиальных отходов, содержащих остаточное количество антибиотиков, является важной промышленной задачей [1], поэтому в настоящее время ведется поиск биологически активных препаратов природного происхождения, способных инактивировать антибиотики разных классов, к которым можно отнести гуминовые вещества, отличающиеся полифункциональностью, полидисперсностью и биофильностью [2]. Цель работы - определение детоксицирующей способности гуминовых веществ по отношению к антибиотикам разного класса методом биотестирования, где в качестве тест-объекта выбран штамм *Escherichia coli* K802. Тест-функция – выход биомассы клеток.

Объекты исследования - гуминовые вещества черноольхового низинного торфа (ЧНТ), выделенные водно-щелочной экстракцией [3]. Модельные токсиканты - антибиотики классов тетрациклина (ингибиторы синтеза белка) и цефалоспорины (ингибиторы синтеза клеточной стенки белка).

Методом биотестирования определена детоксицирующая способность гуминовых веществ черноольхового низинного торфа по отношению к модельным антибиотикам. Максимальная детоксицирующая способность наблюдается по отношению к тетрациклину, особенно при концентрации 110 мг/мл гуминовых веществ, где прирост *E.coli* был в 1,5 раза выше, чем в контрольном образце.

Находящиеся в растворе гуминовые вещества связываются с антибиотиком в комплекс, который не способен взаимодействовать с клеткой. Помимо этого, гуминовые вещества, сорбируясь на поверхности клеток, способны инкапсулировать микроорганизм, не позволяя антибиотикам проникнуть в клетку. Одновременно, сорбированные на поверхности молекулы ГВ, могут десорбироваться с клетки и образовать комплекс с антибиотиком.

Выявлен токсический эффект, оказываемый антибиотиками на микроорганизмы *Escherichia coli* K802: для тетрациклина  $47,33 \pm 0,02\%$ ; доксициклина  $63,36 \pm 0,01\%$ ; цефотоксима  $55,73 \pm 0,02\%$ . Определено влияние гуминовых веществ на рост микроорганизмов *Escherichia coli* K802. Максимальный стимулирующий эффект проявляют ГВ при концентрациях 20, 40, 70, 90, 110 мг/л. Установлено, что присутствие гуминовых веществ в растворе снижает токсический эффект, оказываемый антибиотиками на рост микроорганизмов при всех анализируемых концентрациях (20-110 мг/л). Максимальный детоксицирующий эффект обнаружен по отношению к тетрациклину; снижение токсического эффекта в 3 раза; к доксициклину и цефотоксиму – в 2 раза. Определены количественные характеристики детоксицирующей способности гуминовых веществ по отношению к антибиотикам: коэффициенты детоксикации (%) для тетрациклина 15-67; доксициклина 6-45; цефотоксима 2-58, и значения констант детоксикации: 0,0057 для тетрациклина, 0,0042 для доксициклина, 0,0058 для цефотаксима.

Литература:

1. Kaschl A. *Interaction of humic substances with trace metals and their stimulatory effects on plant growth/ A. Kaschl, Y. Chen // Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. - 2005. - V.*

52. - P. 83–115. 2. Wiley J. *Humic substances and their role in the environment* / John Wiley, Sons Limited, Bernhard S. // *Rep. of Dahlem workshop. Berlin.- 1988. - P. 133- 148.* 3. Дмитриева Е.Д., Леонтьева М.М. Сяндюкова К.В., *Молекулярно-массовое распределение гуминовых веществ и гиматомелановых кислот торфов различного генезиса Тульской области металлов / Химия растительного сырья. 2017. №4. С. 187–194.*

**Финансирование:** Работа выполнена в рамках гранта «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (У.М.Н.И.К.) № 12167ГУ/2017

UDC УДК: 631.417:581.142, ББК:

## USE OF HUMIC SUBSTANCES AS A DETOXIFYING AGENT FOR INACTIVATION OF ANTIBIOTICS

M.Leontyeva, E.Dmitrieva

Tula State University, The Russian Federation, 300028, Tula, Lenin Avenue , 92

Quantitative characteristics of the detoxifying ability of humic substances of peats in the relation to antibiotics of different classes are determined. It is established that the presence of humic substances in solution reduces the toxic effect exerted by antibiotics on the growth of microorganisms.

**Key words:** humic substances, detoxification coefficient, antibiotics, detoxification constant

In the production of biosynthetic antibiotics, the removal of mycelial wastes containing a residual amount of antibiotics is an important industrial problem [1], so currently biologically active preparations of natural origin, capable of inactivating antibiotics of different classes, are being searched for, these agents include humic substances that are polyfunctional, polydispersity and biophilicity [2]. The purpose of this work was to determine the detoxifying ability of humic substances in the relation to antibiotics of different classes by the method of biotesting, where the strain of *Escherichia coli* K802 was chosen as the test object. The test function is the yield of cell biomass. The objects of investigation are humic substances of black alder low peat (BAP), isolated by water-alkaline extraction [3]. Model toxicants are antibiotics of tetracycline classes (inhibitors of protein synthesis) and cephalosporin (inhibitors of protein wall cell synthesis).

The detoxifying ability of humic substances of black alder low peat in the relation to model antibiotics was determined by the method of biotesting. The maximum detoxification ability is observed in the relation to tetracycline, especially at a concentration of 110 mg / ml of humic substances, where the increase in *E. coli* was 1.5 times that of the control sample.

The humic substances in solution are bound with the antibiotic in a complex that is incapable of interacting with the cell. In addition, humic substances, sorbing on the surface of cells, are able to encapsulate the microorganism, not allowing antibiotics to enter the cell. Simultaneously, humic substances, adsorbed on the surface of the molecule, can be desorbed from the cell and form a complex with an antibiotic.

1. The toxic effect of antibiotics on microorganisms of *Escherichia coli* K802 was revealed: for tetracycline  $47.33 \pm 0.02\%$ ; for doxycycline  $63.36 \pm 0.01\%$ ; for cefotaxime  $55.73 \pm 0.02\%$ . 2. The influence of humic substances on the growth of microorganisms *Escherichia coli* K802 is determined. The maximal stimulating effect is shown by humic substances at the concentrations of 20, 40, 70, 90, 110 mg/l. 3. It was established that the presence of humic substances in the solution reduces the toxic effect exerted by antibiotics on the growth of microorganisms at all analyzed concentrations (20-110 mg / l). The maximum detoxification effect was detected in the relation to tetracycline: reduction of toxic effect 3 times; for doxytocin and cefotaxime - in 2 times. 4. Quantitative characteristics of the detoxifying ability of humic substances in the relation to antibiotics were determined: detoxification factors (%) for tetracycline 15-67; for doxycycline 6-45; for cefotaxime 2-58, and detoxification constants values: 0.0057 for tetracycline, 0.0042 for doxycycline, 0.0058 for cefotaxime.

### References:

1. Kaschl A. *Interaction of humic substances with trace metals and their stimulatory effects on plant growth* / A. Kaschl, Y. Chen // *Use of humic substances to remediate polluted environments: from theory to practice. - 2005. - V. 52. - P. 83–115.*
2. Wiley J. *Humic substances and their role in the environment* / John Wiley, Sons Limited, Bernhard S. // *Rep. of Dahlem workshop. Berlin.- 1988. - P. 133- 148.*
3. Dmitrieva E.D., Leontyeva M.M. Syundyukova KV, *Molecular-mass distribution of humic substances and hyamomelanin acids of peat of different genesis of the Tula region of metals / Chemistry of plant raw materials. 2017. №4. Pp. 187-194.*

**Grant:** The work was performed within a grant "Participant of the Youth Scientific and Innovation Contest" (P.Y.S.I.C). №. 12167/2017

УДК 579.66:663.18

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ XANTHOMONAS CAMPESTRIS И СИНТЕЗ КСАНТАНА НА СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ РАСТИТЕЛЬНЫЕ ГИДРОЛИЗАТЫ И ПОБОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Шустов М. Д.<sup>1</sup>, Парамонов Д. А.<sup>2</sup>, Мельников Е. А.<sup>2</sup>, Белодед А. В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва, Россия  
125047, Москва, Миусская пл., д. 9

<sup>2</sup> ООО «ЛАЙТ», Москва, Россия  
107150, Москва, ул. Бойцовая, д. 22, стр. 3  
e-mail: shustoffmax@yandex.ru

Исследовалось культивирование штаммов *Xanthomonas campestris* на средах с индивидуальными источниками углерода и комплексными субстратами, являющимися отходами и побочными продуктами пищевых производств и переработки растительной биомассы. Определены показатели роста и синтеза ксантана штаммами *X. campestris* в различных условиях культивирования. Выход полисахаридов и реологические свойства культуральной жидкости позволяют предположить возможность использования растительных гидролизатов и побочных продуктов пищевых производств для получения ксантана.

**Ключевые слова:** ксантан, экзополисахариды бактерий, *Xanthomonas campestris*, аэробное культивирование, меласса.

Природные полимеры находят все большее применение в разнообразных сферах человеческой деятельности. Среди таких биополимеров можно отметить полисахарид бактериального происхождения – ксантановую камедь или ксантан. Ксантан является высокомолекулярным гетерополисахаридом, продуцируемым фитопатогенными хемоорганогетеротрофными бактериями р. *Xanthomonas*. Ксантан характеризуется хорошей растворимостью в воде и рядом реологических свойств, позволяющих ему найти широкое применение в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности, сельском хозяйстве, а также в нефтегазовой отрасли. Мировое производство ксантана оценивается более чем в 100 тыс. тонн/год и имеет тенденцию к росту. Несмотря на применение ксантана в процессе нефтедобычи, в России нет собственного биотехнологического производства ксантана (большая часть импортируется из Китая, Индии, США и Южной Кореи).

Для разработки рентабельной технологии получения ксантана важным является возможность использования в качестве субстрата для культивирования продуцента полисахарида (*X. campestris*) дешевых источников углерода, например, отходов сельского хозяйства и отходов и побочных продуктов пищевых производств. Поэтому целью работы было изучение роста штаммов *X. campestris* на сложных средах, содержащих как индивидуальные моно- и олигосахариды, так и комплексные субстраты – свекловичную и соевую мелассы, гидролизаты растительного сырья. Культивирование осуществлялось в аэробных условиях в колбах на 50 или 250 мл, при интенсивном перемешивании, а также в биореакторе на 5 л с различным заполнением средой и скоростью перемешивания, pH среды составлял 6,8-7,0, температура поддерживалась 28 °С.

Всего было исследовано 5 штаммов *X. campestris*: изучена динамика роста культур микроорганизмов, образование капсул и синтез ксантана, а также морфология клеток при культивировании на средах с глюкозой. Все штаммы росли в аэробных условиях и оказались способны продуцировать экзополисахариды с разным выходом. Выбранные штаммы утилизировали широкий спектр индивидуальных моно- и олигосахаридов. Наилучший биосинтез ксантана наблюдался при культивировании на сахарозе и глюкозе и составлял до 50 % от потребленных углеводов. При использовании комплексных субстратов также наблюдался рост культур и синтез ксантана, что сопровождалось явными реологическими изменениями культуральной жидкости. Показатели процесса ферментации существенно не уступали культивированию на индивидуальных субстратах и больше зависели от условий культивирования (аэрации, интенсивности перемешивания, температуры и т.д.).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что свекловичная и соевая мелассы, а также другие отходы пищевой промышленности и сельского хозяйства могут быть использованы в качестве дешевого сырья для получения ксантана культивированием выбранных штаммов *X. campestris*.

UDC 579.66:663.18

## XANTHOMONAS CAMPESTRIS CULTIVATION AND XANTHAN SYNTHESIS ON NUTRIENT MEDIA CONTAINING VEGETABLE HYDROLYSATES AND SIDE PRODUCTS OF FOOD INDUSTRY

Shustov M. D.<sup>1</sup>, Paramonov D. A.<sup>2</sup>, Melnikov E. A.<sup>2</sup>, Beloded A. V.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> ООО «LIGHT», Moscow, Russia

e-mail: shustoffmax@yandex.ru

In the present work we investigated *Xanthomonas campestris* strains growth on nutrient media containing individual carbon sources and complex substrates, which are side products of food industry and vegetable biomass processing. Growth and xanthan synthesis parameters with *X. campestris* strains in different cultivation conditions were defined. Polysaccharides yield and reological properties of the cultural medium allow to assume the possibility of using vegetable hydrolyzates and side products of food industry for xanthan production.

**Key words:** xanthan, bacteria exopolysaccharides, *Xanthomonas campestris*, aerobic cultivation, molasses.

Natural polymers are more and more applied in different spheres of human activity. Among these polymers xanthan gum or xanthan can be noted. Xanthan is a high molecular heteropolysaccharide, produced by phytopathogenic chemoorganotrophic bacteria of g. *Xanthomonas*. Xanthan is well soluble in water and has multiple reological properties which allow this polysaccharide to find wide application in food, cosmetic and pharmaceutical industry, agriculture and oil and gas industry. Xanthan has also such properties as biocompatibility, the lack of toxicity, it is biodegradable but does not show significant degradation in human digestive tract. Xanthan world production is 90-100 thousand tons a year and has a tendency to increase. Despite xanthan application in oil extraction, there is no biotechnological production of xanthan in Russia (major part is imported from China, India, the USA and South Korea), so the development of xanthan production technology is an actual challenge.

For a cost-effective technology of xanthan production the possibility of using cheap carbon sources such as agricultural waste and side products of food industry as the substrate for xanthan-producing microorganism (*X. campestris*) cultivation is important. Therefore, the objective of the work was to investigate the growth of *X. campestris* strains on complicated nutrient media containing both individual mono- and oligosaccharides and complex substrates – beet and soy molasses, vegetable raw material hydrolyzates. The cultivation was carried out in aerobic conditions in 50 and 250 ml flasks with intensive stirring and in a 5 L bioreactor with different filling with medium and different stirring speed, the pH was 6,8-7,0, the temperature was maintained at 28°C.

In total, five strains of *X. campestris* were examined: the growth dynamics of the cultures, capsule-forming, xanthan synthesis and cell morphology during cultivation on glucose-containing nutrient media were studied. All the strains grew in aerobic conditions and produced exopolysaccharides with different yield. The selected strains are able to use a wide range of pure mono-, di- and oligosaccharides. The best xanthan biosynthesis of 50% of the consumed carbohydrates was shown at cultivation on sucrose and glucose. When using vegetable hydrolyzates and side products of food industry as a complex substrate we also noticed the cultures growth accompanied by reological changes of cultural medium. The fermentation process parameters did not concede the ones at cultivation on individual substrates and depended more on cultivation conditions (aeration, stirring intensity, temperature, etc.).

The obtained data allows to conclude that beet and soy molasses and other food industry and agriculture wastes can be used as cheap raw materials for xanthan production with the selected *X. campestris* strain cultivation.

УДК 547.442 + 541.148

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ ОКСИГЕНАТОВ ИЗ УГЛЕВОДИСТОГО СЫРЬЯ

**Вольева В. Б., Комиссарова Н. Л., Малкова А. В., Овсянникова М. Н., Усманов Р. А., Гумеров Ф. М.**

*Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Москва, Россия  
119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4  
e-mail: komissarova@polymer.chph.ras.ru*

Разработан новый подход к модернизации производства биоэтанола из лигноцеллюлозных материалов с использованием моносахаридов гемицеллюлозы в создании топливных форм, а также новый синтез биодизеля без свободного глицерина, сочетающий алкоголиз триглицерида с кетализацией глицерина низшими карбонильными соединениями или их диалкилкеталами *in situ*.

**Ключевые слова:** биоэтанол, биодизель, моносахариды, глицерин, золькеталь.

Развивается новый подход к модернизации производства биоэтанола из лигноцеллюлозных материалов и биодизеля из растительных триглицеридов, обеспечивающий большую полноту использования сырьевого ресурса. Трансформация моносахаридов гемицеллюлозы (ксилозы и арабинозы) и биодизельного глицерина в гидрофобизированную топливную форму осуществляется в результате конденсации с карбонильными соединениями, главным образом с ацетоном, с образованием циклических кеталей (золькеталь, дикетали моносахаридов). В бинарных композициях с низшими спиртами циклические кетали обнаруживают октанповышающий эффект, значительно превышающий аддитивную величину эффектов индивидуальных кетала и спирта, обеспечивают фазовую стабильность композиционного топлива [1]. Бинарные оксигенаты могут вытеснить из использования метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ), негативные свойства которого создают нагрузку на окружающую среду.

Набор биооксигенатов из углеводистого сырья может быть расширен за счет внедрения в его переработку биокаталитических методов. На основе использования специализированных ацидогенных микробных ассоциаций (биокатализатор) создан биопроцесс, нацеленный на продуцирование легких жирных кислот и этанола – полупродуктов для синтеза этилкарбоксилатов – легкого аналога биодизеля. Применение в процессе конденсации суперкритического этанола увеличивает набор компонентов такого биодизеля в результате этилирования кислотных и алкоксильных фрагментов этилкарбоксилатов.

Специальным решением проблемы биодизельного глицерина может быть его связывание в золькеталь непосредственно в процессе алкоголиза триглицерида в смешанной среде этанол – ацетон (или диэтилкеталь ацетона) в условиях кислотного катализа, т.е., биодизель без свободного глицерина. Наилучшим вариантом для проведения такого процесса является использование продукта сопряженной кетализации глицерина и этанола ацетоном – азеотропной смеси, содержащей золькеталь, диэтилкеталь, ацетона и этанол.

*Литература:*

1. Евразийский патент №018090 В1, 30.05.2013

Варфоломеев С. Д., Никифоров Г. А., Вольева В. Б., Макаров Г. Г., Трусов Л. И. Средство для повышения октанового числа бензинового автомобильного топлива // Евразийский патент № 201001729. 2009.05.27 Бюл. № 3

UDC 547.442 + 541.148

## A NEW APPROACH TO MODERNIZATION OF BIOETHANOL PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSES MATERIALS AND BIODIZEL FROM PLANT TRIGLYCEROLS IS DEVELOPED

Vol'eva V. B., Komissarova N. L., Malkova A. V., Ovsyannikova M. N., Usmanov R. A., Gumerov F. M.

*N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation  
 119334, Moscow, Kosygina st. 4  
 e-mail: komissarova@polymer.chph.ras.ru*

A new approach to bioethanol production from lignocellulose materials with transformation of hemicellulose monosaccharides to fuel form is developed. A new synthesis of biodizel without free glycerol combined the alcoholysis of triglycerides with the ketalization of glycerol by low carbonyl compounds or its dialkylketals in situ.

Keywords: bioethanol, biodizel, monosaccharides, glycerol, solketal.

A new approach to modernization of bioethanol production from lignocelluloses materials and biodizel from plant triglycerols is developed. This provides full utilization of starting materials. The transformation of hemicellulose monosaccharides (xylose and arabinose) and biodizel glycerol to hydrophobic fuel form is carried via condensation with carbonyl compounds, mainly acetone, with formation of cyclic ketals (solketal, diketals of monosaccharides). Cyclic ketals in binary compositions with low alcohols show boost in the octane index larger than additive effect of individual ketal and alcohol and phase stability in a wide temperature range [1]. Proposed binary oxygenates may replace methyl-tert-butyl ether with its unfavorable influence on environment.

A set of biooxygenates from natural saccharides may be increased by using of biocatalytic methods. Specialized acidogenic microbial communities (biocatalyst) are used for creating of bioprocess directed to the production of volatile fatty acids. These acids are the semiproducts for the synthesis of ethyl esters which may be regarded as light biodiesel analog. The use of supercritical ethanol in the esterification process increases the set of such a biodizel components as the result of ethylation of acidic and alkoxy fragments of ethylcarboxylates.

The problem of biodizel glycerol may be solved by simultaneous with alcoholysis transformation to solketal in the mixed medium alcohol – acetone (or its diethyl ketal) under acid catalysis. This process may be named "biodizel without glycerol". The best mode of such a process may be based on the use of the azeotropic mixture containing solketal, acetone diethylketal and ethanol which is the product of cooperative glycerol and ethanol ketalisation by acetone.

### References:

1 EP №018090 B1, 30.05.2013

Varfolomeev S. D., Nikiforov G. A., Vol'eva V. B., Makarov G. G., Trusov L. I. Gasoline automobile fuel comprising agent for increasing the octane number // EP № 201001729. 2009.05.27 Bull. № 3

УДК: 635.8, ББК: 43.98

## НОВЫЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ КСИЛОТРОФНЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

А.В.Гольшкин, Н.Р.Альмяшева, М.Ю.Зиангирова, Л.М.Краснопольская

*Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе, Россия, 119021, Москва, Большая пириговская, 11, pilyut365@mail.ru, +79858954289*

Проведено сравнение способов проведения предобработки различных лигноцеллюлозных субстратов. Продемонстрировано существенное влияние предобработки на биодоступность субстратов для ксилотрофных базидиомицетов.

**Ключевые слова:** предобработка, лигноцеллюлозное сырье, биодоступность, ксилотрофные базидиомицеты, плодовые тела.

Разработка новых эффективных субстратов для культивирования съедобных ксилотрофных грибов, актуальна как для получения высококачественной пищевой продукции, так и для рационального исполь-

зования природных ресурсов [1,2]. Ценное сырье, которое может быть включено в существующие производственные циклы, представляют собой опилки и кора хвойных пород деревьев. Однако эти отходы помимо целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина содержат соединения, подавляющих рост грибов и ухудшающих качество получаемой продукции. Удаление нежелательных компонентов может быть осуществлено в процессе предобработки физическими, химическими или биологическим методами воздействия [3].

Была установлена зависимость физиолого-биохимических характеристик ксилотрофных лекарственных и съедобных базидиальных грибов *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer и *Hericium erinaceus* (Bull.) Persoon от способа предобработки листовых и хвойных опилок. В работе оценивали рост мицелия, формирование плодовых тел и содержание в них белков и полисахаридов. Предобработки минеральными кислотами, щелочью и пероксидом водорода способствовали увеличению биодоступности опилок для *G. lucidum*. Повышение скорости роста и плотности мицелия *F. velutipes* и *H. erinaceus* было отмечено только на опилках после кислотных предобработок. Исследование влияния предобработки опилок на урожайность и биохимический состав плодовых тел *H. erinaceus* показало, что кислотная предобработка приводит к значительному сокращению времени выхода на плодоношение с 63 до 35 суток по сравнению с непредобработанными опилками. Предобработка опилок сосны и бука соляной кислотой обеспечивала появление второй волны плодоношения *H. erinaceus*. Достоверное увеличение урожайности *H. erinaceus* по сравнению с контролем обеспечивала только солянокислотная предобработка опилок сосны.

#### Литература:

1. Stamets P. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms* / Ten Speed Press, 2011. 614 p. 2. Голышкин А.В., Альмяшева Н.Р., Зиангирова М.Ю., Краснопольская Л.М. Зависимость физиолого-биохимических характеристик базидиального гриба *Hericium erinaceus* от способа предобработки лигноцеллюлозного сырья // Успехи медицинской микологии. – 2018. – Т. 19. – С. 130-131. 3. Zheng Y., Pan Z., Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production // *International journal of agricultural and biological engineering*. 2009. Vol.2. №3. p. 51-68.

UDC 635.8, BBC 43.98

## NEW SUBSTRATES FOR PRODUCTION OF FRUIT BODIES OF XYLOTROPHIC BASIDIOMYCETES

A.Golyshkin, N.Almyasheva, M.Ziangirova, L.Krasnopolskya

Gause Institut of New Antibiotics, Russia, 119021, Moscow, Bol'shaya Pirogovskaya, 11

Pretreatment methods of various lignocellulose substrates was compared. The significant influence of pretreatment on bioavailability of substrates for xylotrophic basidiomycetes was shown.

**Key words:** pretreatment, lignocellulose raw materials, bioavailability, xylotrophic basidiomycetes, fruit bodies.

The development of new effective substrates for cultivation of edible xylotrophic basidiomycetes is relevant in terms of production of high-quality food products and rational use of natural resources [1]. Sawdust and bark of coniferous trees are a valuable raw material that can be included in existing technologies. However, these wastes contain compounds that inhibit the growth of mycelium and impair the quality of the products obtained. Pretreatment by physical, chemical or biological methods causes the removal of unwanted components of lignocellulosic wastes [2-3].

The effect of pretreatment of deciduous and coniferous sawdust on the physiological and biochemical characteristics of xylotrophic and edible basidiomycetes *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer and *Hericium erinaceus* (Bull.) Persoon was determined. Mycelium growth, fruit bodies formation and protein and polysaccharide contents were evaluated. Mineral acids, alkali and hydrogen peroxide pretreatments increased the bioavailability of sawdust for *G. lucidum*. The best substrate mixtures for *F. velutipes* and *H. erinaceus* mycelium growth contained sawdust after acid pretreatments. The investigation of the effect of sawdust pretreatment on yield and biochemical composition of fruit bodies of *H. erinaceus* showed that acid pretreatment significantly decreases fruition time from 63 to 35 days compared to sawdust without pretreatment. The second waves of fructification were observed during the cultivation of *H. erinaceus* on the pine and beech sawdust after hydrochloric acid pretreatment. Hydrochloric acid pretreatment of pine sawdust leads to improvements in fruit bodies of *H. erinaceus* yield compared to control.



## References:

1. Stamets P. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms* / Ten Speed Press, 2011. 614 p. 2. Golyshkin A.V., Almyasheva N.R., Ziangirova M.Y., Krasnopol'skaya L.M. The dependence of pretreatment of lignocellulosic substrates on physiological and biochemical characteristics of xylophilic basidiomycetes *Hericium erinaceus*// *Advances in medical mycology*. – 2018. – Vol. 19. – p. 190-131. 3. Zheng Y., Pan Z., Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production // *International journal of agricultural and biological engineering*. 2009. Vol.2. №3. p. 51-68.

УДК 577.15; 547.458

## НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ ДЛЯ КОРМОВОГО ПРИМЕНЕНИЯ

**Синицын А.П.<sup>1,2</sup>, Рожкова А.М.<sup>1,2</sup>, Зоров И.Н.<sup>1,2</sup>, Синицына О.А.<sup>1,2</sup>, Короткова О.Г.<sup>1,2</sup>, Осипов Д.О.<sup>2</sup>, Шашков И.А.<sup>2</sup>, Сатрутдинов А.Д.<sup>2</sup>, Рубцова Е.А.<sup>2</sup>, Кондратьева Е.Г.<sup>2</sup>, Волчок А.А.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия, 119071 Москва, Ленинский пр., 33/2

e-mail: [apsinitsyn@gmail.com](mailto:apsinitsyn@gmail.com)

Созданы кормовые ферментные препараты нового поколения, в состав которых входит сбалансированный комплекс ферментов карбогидраз, обладающих высокой активностью по отношению к некрахмальным полисахаридам злаков (целлюлозе, β-глюкану, ксилану), повышенной стабильностью к воздействию высокой температуры, применяемой при гранулировании комбикормов, и не подверженных ингибированию белковых ингибиторов злаков.

**Ключевые слова:** кормовые ферментные препараты, биокатализаторы, ксиланаза, эндоглюканаза, белковые ингибиторы, *Penicillium verruculosum*

Для производства кормов в животноводстве и птицеводстве широко применяются злаковые культуры (пшеница, рожь, овес, ячмень). Помимо питательных веществ (крахмал, белки) зерно злаковых содержит некрахмальные полисахариды (НПС) – целлюлозу, β-глюканы, ксиланы, что является причиной неполного усвоения кормов. Моногастричные животные, а также птицы, не имеют собственных ферментов, способных эффективно расщеплять НПС, поэтому в кормопроизводстве в качестве добавок используются ферментные препараты (ФП), в состав которых входят целлюлазы, β-глюканы и ксиланы. Использование этих ФП позволяет уменьшить вязкость содержимого кишечника и повысить усвояемость питательных веществ за счёт разрушения НПС.

Нами были получены новые рекомбинантные штаммы *Penicillium verruculosum*, продуцирующие гомологичную эндоглюканазу 2 (Ег2) и гетерологичную ксиланазу Е (КсилЕ) *P.canescens*. С помощью этих штаммов получены ФП, существенно обогащённые Ег2 и КсилЕ, обладающие высокой активностью по отношению к НПС. Новые ФП содержали 16-17% Ег2, 48-63% КсилЕ и 17-30% целлюбиогидролаз от общего количества белка, тогда ФП, полученный с помощью штамма-реципиента *P.verruculosum*, содержал 1,4% Ег2, около 60% целлюбиогидролаз и не имел в своём составе КсилЕ. Оптимальными значениями pH для целлюлазной (по отношению к КМЦ) и ксиланазной активностей новых ФП были 4,0 и 5,5, соответственно, при этом они проявляли указанные активности при широком значении pH (от 3 до 7). Для КМЦ-азной и ксиланазной активностей ФП оптимальной являлась температура 60 и 70°C, ФП проявляли эти активности при температурах от 20 до 80°C. ФП имели высокую стабильность КМЦ-азной и ксиланазной активностей при температурах от 50 до 80°C. Ксиланаза новых ФП практически не ингибировалась белковыми ингибиторами ржи.

Исследование выполнено за счёт гранта Минобрнауки России, идентификационный номер ПНИЭР RFMEFI60716X0159.

UDC 577.15; 547.458

## NEW ENZYMES FOR FEED APPLICATIONS

**Sinitsyn A.P.<sup>1,2</sup>, Rozhkova A.M.<sup>1,2</sup>, Zorov I.N.<sup>1,2</sup>, Sinitsyna O.A.<sup>1,2</sup>, Korotkova O.G.<sup>1,2</sup>, Osipov D.O.<sup>2</sup>, Shashkov I.A.<sup>2</sup>, Satrutdinov A.D.<sup>2</sup>, Rubtsova E.A.<sup>2</sup>, Kondratieva E.G.<sup>2</sup>, Volchok A.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninsky Pr. 33/2, Moscow 119071, Russia

e-mail: [apsinitsyn@gmail.com](mailto:apsinitsyn@gmail.com)

A feed enzyme preparations of new generation, which includes a balanced complex of carbohydrase enzymes with high activity towards cereal non-starch polysaccharides (cellulose,  $\beta$ -glucan, xylan), high stability to influence of high temperatures used in the pelleting of animal feed, and not affected by the inhibition of protein inhibitive cereals, were created.

**Key words:** feed enzyme preparations, biocatalysts, xylanase, endoglucanase, protein inhibitors, *Penicillium verruculosum*

For feed production in livestock and poultry are widely used cereals (wheat, rye, oats, barley). Besides nutrients (starch, protein) grain cereals contain non-starch polysaccharides (NSP) – cellulose,  $\beta$ -glucans, xylans, which cause the incomplete assimilation of feed. Mono-gastric animals and poultry have no enzymes that can effectively break down the NPCs, so in feed production as an additive used enzyme preparations (EP) composed of cellulases,  $\beta$ -glucanases and xylanases. The use of these EP allows to reduce the viscosity of intestinal contents and improve digestibility of nutrients due to the destruction of the NPCs.

We obtained new recombinant strains *Penicillium verruculosum*, producing homologous endoglucanase 2 (Eg2) and heterologous xylanase *E. P. canescens* (Xyle). Using these strains we obtained new EPs significantly enriched by Eg2 and Xyle, which has high activity toward plant NPCs. New EPs contained 16-17% Eg2, 48-63% of the Xyle and 17-30% of cellobiohydrolase among total protein, then EP obtained by using recipient strain of *P. verruculosum* contained 1.4% of Eg2, about 60% of cellobiohydrolase and did not contain the Xyle. The optimal pH for cellulase (CMC-ase activity) and for xylanase activity of new EPs was 4.0 and 5.5, respectively, while they showed these activities in a wide pH range (3 to 7). For CMC-ase and xylanases optimum activity was at 60 and 70°C, EPs was active from 20 to 80°C. New EPs showed the highest stability of CMC-ase and xylanase activity at temperatures from 50 to 80°C. Xylanase activity new FPs is practically not inhibited by protein inhibitors of rye.

This work was supported by the Ministry of Science and Education of Russian Federation (grant RFMEFI60716X0159.).

УДК 577.15

## НОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ ДЕСТРУКЦИЮ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

**Гусаков А.В.<sup>1,2</sup>, Булахов А.Г.<sup>2</sup>, Доценко А.С.<sup>2</sup>, Рожкова А.М.<sup>1,2</sup>, Волков П.В.<sup>2</sup>, Сеницын А.П.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия, 119071 Москва, Ленинский пр., 33/2

e-mail: [avgusakov@enzyme.chem.msu.ru](mailto:avgusakov@enzyme.chem.msu.ru)

Рассмотрены различные аспекты ферментативной деструкции целлюлозы. Особое внимание уделено недавним открытиям в области биодеградации полисахаридов, а именно литическим полисахаридмонооксигеназам и новой функции N-связанных гликанов в катализе целлюлазами.

**Ключевые слова:** целлюлазный комплекс, ферментативный гидролиз целлюлозы, полисахаридмонооксигеназы, синергизм, N-гликозилирование.

Целлюлолитические ферменты, входящие в состав так называемого целлюлазного комплекса, осуществляют в природе биодеградацию целлюлозы – самого распространенного биополимера на Земле. Основными разрушителями целлюлозы являются микроорганизмы, а именно микроскопические грибы

и бактерии. На протяжении нескольких десятилетий в разных странах мира ведутся интенсивные разработки биотехнологий переработки возобновляемого лигноцеллюлозного сырья с применением целлюлаз с целью получения жидких видов биотоплива и других полезных продуктов, которые в последние годы достигли уровня промышленного масштабирования.

До недавнего времени считалось, что в ферментативной деструкции целлюлозы участвуют исключительно целлюлазы гидролитического типа действия – эндоглюканазы (ЭГ), экзо-целлобиогидролазы (ЦБГ) и  $\beta$ -глюкозидазы. Однако несколько лет назад были открыты новые ферменты, осуществляющие окислительную деструкцию целлюлозы и других природных полисахаридов, названные литическими полисахаридмонооксигеназами (ПМО). В нашей лаборатории были выделены и охарактеризованы ПМО из грибов *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei*, *Myceliophthora thermophila*. В рекомбинантном штамме гриба *Penicillium verrucosum* методом генетической инженерии также был получен и экспрессирован химерный белок, N-домен которого представляет собой ПМО *T. terrestris*, а C-домен – целлюлозосвязывающий модуль (ЦСМ) от ЦБГ I из *P. verrucosum*. При действии на целлюлозные субстраты все ПМО проявляли синергизм как с индивидуальными целлюлазами, так и с целлюлазным комплексом в целом. При добавлении ПМО к целлюлазам в количестве не более 10% по белку выход сахаров в результате ферментативного гидролиза целлюлозы возрастал на 30-40% и более. В результате присоединения ЦСМ химерный фермент приобрел ряд интересных и полезных для практического применения свойств. В частности, он обладает более широкой субстратной специфичностью и повышенной активностью по отношению к целлюлозе.

Другим важным фактором, оказывающим значительное влияние на катализ целлюлазами, на который ранее не обращали особого внимания, является N-гликозилирование ферментов. На примере рекомбинантных ЦБГ I, ЦБГ II и ЭГ II из *P. verrucosum* мы показали, что в зависимости от местоположения N-связанных гликанов на поверхности белковой глобулы они могут влиять на активность ферментов как положительно, так и отрицательно. Данные о новой функции N-гликанов в катализе целлюлазами имеют большое значение при разработке новых, более активных биокатализаторов методами белковой инженерии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00163).

Литература:

1. Гусаков А.В., Синицын А.П. Деполимеризация природных биополимеров. Ферментативный гидролиз целлюлозы // *Химия биомассы: биотоплива и биопластики*. – М.: Научный мир, 2017. – С. 65-99.

UDC 577.15

## NEW ENZYMES AND FACTORS AFFECTING THE ENZYMATIC DESTRUCTION OF CELLULOSE

Gusakov A.V.<sup>1,2</sup>, Bulakhov A.G.<sup>2</sup>, Dotsenko A.S.<sup>2</sup>, Rozhkova A.M.<sup>1,2</sup>, Volkov P.V.<sup>2</sup>, Sinitsyn A.P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Leninsky Pr. 33/2, Moscow 119071, Russia

e-mail: avgusakov@enzyme.chem.msu.ru

Various aspects of the enzymatic degradation of cellulose are discussed, and special attention is given to recent discoveries in the field of biodegradation of polysaccharides, namely to lytic polysaccharide monoxygenases and a new function of N-linked glycans in the catalysis by cellulases.

**Key words:** cellulase complex, enzymatic hydrolysis of cellulose, lytic polysaccharide monoxygenases, synergism, N-glycosylation.

Cellulolytic enzymes, the components of the so-called cellulase complex, catalyze the biodegradation of cellulose – the most abundant biopolymer on Earth. The main destroyers of cellulose are microorganisms, that is, filamentous fungi and bacteria. For several decades, the intensive development of biotechnology of processing the renewable lignocellulosic feedstocks, based on cellulases, has been carried out with the aim of obtaining liquid biofuels and other useful products. In recent years, this kind of biotechnology reached the industrial scale level in some countries.

Until recently, the enzymatic degradation of cellulose was thought to be exclusively catalyzed by only cellulases of the hydrolytic type of action, that is, by endoglucanases (EG), exo-cellobiohydrolases (CBH) and  $\beta$ -glucosidases. However, a few years ago new enzymes catalyzing the oxidative degradation of cellulose and other polysaccharides,

called lytic polysaccharide monoxygenases (LPMO), have been discovered. In our laboratory, we isolated and characterized LPMOs from fungi *Thielavia terrestris*, *Trichoderma reesei* and *Myceliophthora thermophila*. A chimeric protein, N-domain of which represents the LPMO of *T. terrestris* and C-domain represents a cellulose-binding module (CBM) of the CBH I from *Penicillium verrucosum*, was constructed and expressed in the recombinant strain of *P. verrucosum* using a genetic engineering technique. All the LPMOs under study demonstrated a synergism with individual cellulases and the whole cellulase complex during their action on cellulosic substrates. After adding not more than 10% of LMPO to a cellulase preparation, the yield of sugars in the enzymatic hydrolysis of cellulose increased by 30-40% or more. As a result of the CBM attachment, the chimeric enzyme has acquired a number of interesting and useful for practical applications properties. In particular, the chimeric LMPO displayed broader substrate specificity and the enhanced activity against cellulose.

Another important factor, that has a significant influence on the catalysis by cellulases and which function was not well understood, is the enzyme N-glycosylation. Using site-directed mutagenesis of the recombinant CBH I, CBH II and EG II from *P. verrucosum*, we showed that depending on the location of the N-linked glycans on the surface of a protein globule they can affect the enzyme activity either positively or negatively. This knowledge about a new function of N-linked glycans in the catalysis by cellulases is important for the development of new more active biocatalysts by protein engineering techniques.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 16-14-00163).

#### References:

1. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. *Depolymerization of natural biopolymers. Enzymatic hydrolysis of cellulose // Chemistry of Biomass: Biofuels and Bioplastics.* – Moscow: Scientific World Publisher, 2017. – P. 65-99.

УДК 602.3:579.8

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *TRICHODERMA VIRIDE*

Епишкина Ю. М., Тур А. В., Баурин Д.В., Шакир И. В., Панфилов В. И.

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1  
E-mail: epishkina.yulia2906@gmail.com

Поиск альтернативных коммерческим препаратам источников целлюлаз является актуальной задачей биотехнологии. В исследование были подобраны оптимальные условия культивирования *Trichoderma viride* и показан потенциал штамма для использования в процессе биоконверсии растительного сырья.

**Ключевые слова:** целлюлазы, глубинное культивирование, *Trichoderma viride*, растительное сырье, биоконверсия.

Более 1,3 млрд тонн отходов во всём мире образуется при производстве продуктов питания, большинство из них используется неэффективно [4], поэтому исследования в области переработки растительного сырья по-прежнему остаются лидирующим направлением биотехнологии.

При производстве пищевых продуктов образуются ценные вторичные продукты. Для Российской Федерации таковыми являются шрот подсолнечника [3], свекловичный жом, жом топинамбура [1], кофейный шлам [2]. Применение перечисленных субстратов в качестве кормового продукта затруднено из-за высокого содержания клетчатки. Ранее на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева были исследованы различные способы предобработки растительного сырья [3], включая ферментативные и химические. Ферментативные методы представляют перспективную альтернативу химическим из-за своей экологичности, энергетической выгоды, возможности эффективного снижения содержания клетчатки, а также из-за нивелирования формирования ингибирующих веществ (фурфурол, оксиметилфурфурол) в результате предобработки субстрата. Микробные ферментные комплексы могут применяться для исследования гибридных материалов на основе сложных неорганических и органических соединений. Применение мультиферментных комплексов является наиболее эффективным, так как обеспечивает наиболее полный гидролиз полисахаридов до моносахаридов, обеспечивая лучшую деградацию сырья. Целлюлолитические ферментные препараты являются преимущественно продуктами микроскопических грибов. В настоящее время грибы рода *Trichoderma* занимают основную позицию среди промышленных грибных продуцентов целлюлаз и гемицеллюлаз. Это объясняется способностью продуцировать широкий спектр целлюлолитических ферментов (целлюлазы,  $\beta$ -глюкозидазы, эндо- и экзоглюканазы), широкой субстрат-

ной специфичностью и высокой секреторной способностью.

Целью данного исследования было изучение возможности использования культуральной жидкости *Trichoderma viride* для предобработки депротеинизированного шрота подсолнечника, с целью снижения содержания сырой клетчатки, как альтернатива использованию коммерческих целлюлаз и изучение процессов биodeградации гибридных материалов, имеющих органическую составляющую. В настоящей работе определена целлюлолитическая активность штамма, оптимизирован состав среды. Определено влияние ионов металлов ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) и лактозы в среде на изменение ферментативной активности штамма. Показано, что при концентрации лактозы в среде в пределах 0,1-0,25 г/л, наибольшая активность штамма определялась при концентрации 0,15 г/л, а дальнейшее увеличение концентрации не отражалось на ферментативной активности.

Работа выполнена в рамках базовой части Госзадания № 10.4702.2017/БЧ

Литература:

1. Alexandrino T.D. [и др.]. *Fractioning of the sunflower flour components: Physical, chemical and nutritional evaluation of the fractions* // *LWT-Food Science and Technology*. 2017.
2. Bashashkina E.V. [и др.]. *Bioconversion of waste products of soluble coffee production into forage products (in Russia)* // *Ecology and Industry of Russia (journal in Russian)*. 2010. № 1. 18–19 с.
3. Baurin D. V., Gordienko M.G., Shakir I.V., Panfilov V.I. *Integrated processing of sunflower meal Albena, Bugaria: 14th SGEM GeoConference on Nano, Bio and Green -Technologies for a Sustainable Future, 2014*. 419–426 с.
4. Principato L. *The Complexity of Food Waste at Consumption Level: Definitions, Data, Causes and Impacts* Springer, 2018. 1–13 с.

UDC 602.3:579.8

## DETERMINATION OF CELLULOLYTIC ACTIVITY OF TRICHODERMA VIRIDE

**Epishkina. Y. M., Tur A. V., Baurin D.V., Shakir. I V., Panfilov. V.I.**

*Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia*  
 125480, Moscow, Geroev Panfilovtsev st., 20  
 E-mail: epishkina.yulia2906@gmail.com

The search for sources of cellulases, which would become an alternative to commercial preparations, is a topical problem of biotechnology. In this research the optimal conditions for the cultivation of *Trichoderma viride* were chosen and the potential of the fungus for use in the bioconversion of plant raw materials was shown.

**Key words:** Cellulases, deep heterophase cultivation, *Trichoderma viride*, plant raw materials, bioconversion.

More than 1.3 billion tonnes of waste are generated in food production all over the world, most of them are used inefficiently [4], so the research in the field of plant raw materials remains the leading direction of biotechnology.

Valuable secondary products are formed in food production. For the Russian Federation such products are sunflower meal [3], beet pulp, beet artichoke [1], coffee sludge [2]. The usage of these substrates as a fodder product is hampered by the high content of fibre. Various ways of pretreatment of plant raw materials including enzymatic and chemical methods were studied [3] earlier at the Department of Biotechnology D. I. Mendeleyev. Enzymatic methods represent a promising alternative way of pretreatment to chemical ones because of its environmental friendliness, energy benefits, the possibility of effective reduction of fiber content, and also because of levelling of the formation of inhibitory substances (furfural, hydroxymethylfurfural) as a result of pretreatment of the substrate. Microbial enzymatic complexes can be used to researching hybrid materials that based on compound inorganic and organic matters. The usage of multienzyme complex is the most effective because it provides the most complete hydrolysis of carbohydrates from polysaccharides to monosaccharides, providing better degradation of raw materials. Cellulolytic enzyme preparations are mainly products of microscopic fungus. Currently, fungi of the genus *Trichoderma* occupy the main position among industrial fungal producers of cellulases and hemicellulases. This is due to the ability to produce a wide range of cellulolytic enzymes (cellulase,  $\beta$ -glucosidase, endo- and exoglucanase), broad substrate specificity and high secretory ability.

The purpose of this research was to study the possibility of using culture liquid of *Trichoderma viride* for pretreatment of deproteinized sunflower meal in order to reduce the content of crude fibre as an alternative to the use of commercial cellulase and studying the processes of biodegradation of hybrid materials which have an organic component. In the present paper the cellulolytic activity of a strain was defined, medium composition was optimized. The influence of metal ions ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ) and lactose in the medium to change the enzymatic activity of the strain was determined. It was shown that at concentration of lactose in the medium within 0.1-0.25 g/L, the

greatest activity of a strain was determined at a concentration of 0.15 g/L, and further increase of concentration did not reflect on enzymatic activity.

The research was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, the State Assignment Basic part, project №10.4702.2017/БЧ.

*References:*

1. Alexandrino T.D. [и др.]. Fractioning of the sunflower flour components: Physical, chemical and nutritional evaluation of the fractions // *LWT-Food Science and Technology*. 2017.
2. Bashashkina E.V. [и др.]. Bioconversion of waste products of soluble coffee production into forage products (in Russian) // *Ecology and Industry of Russia (journal in Russian)*. 2010. № 1. 18–19 с.
3. Baurin D.V., Gordienko M.G., Shakir I.V., Panfilov V.I., *Integrated processing of sunflower meal Albena, Bugaria: 14th SGEM GeoConference on Nano, Bio and Green -Technologies for a Sustainable Future, 2014*. 419–426 с.
4. Principato L. *The Complexity of Food Waste at Consumption Level: Definitions, Data, Causes and Impacts* Springer, 2018. 1–13 с.

УДК 664.162.6:577.152

## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

**Миринова Г.Ф., Кащеева Е.И., Скиба Е.А., Кухленко А.А.**

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

Оптимизирован состав мультиэнзимной композиции (МЭК) на основе ферментных препаратов «Целлолюкс-А», «Ультрафло Коре» и «Брюзайм ВГХ» для гидролиза продукта азотнокислой обработки шелухи овса с целью получения питательной среды, предназначенной для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ).

**Ключевые слова:** мультиэнзимная композиция; симплекс-центроидный план; ферментативный гидролиз; бактериальная наноцеллюлоза.

Получение ценной БНЦ из малоценной растительной целлюлозы является одним из прорывных решений в технологии этого перспективнейшего материала. Известно, что питательные среды, получаемые из целлюлозосодержащего сырья, могут содержать ингибиторы микробиологического синтеза, поэтому крайне важной является фундаментальная инженерная проработка каждой технологической стадии процесса [1, 2]. Одной из ключевых стадий получения БНЦ является ферментативный гидролиз химически предобработанного сырья. Стадия должна обеспечивать максимальный выход сахаров за короткое время. Целью данной работы являлась оптимизация состава МЭК целлюлазно-глюканазно-ксилааназного действия.

Субстратом для ферментативного гидролиза являлся продукт азотнокислой обработки шелухи овса, полученный на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН. Ферментативный гидролиз субстрата проводили в 0,1 М ацетатном буферном растворе (рН 4,6); концентрация субстрата – 30 г/л, температурный режим – 46±2 °С, скорость перемешивания – 120 об/мин, продолжительность процесса – 72 ч. В качестве варьируемых параметров МЭК принимались концентрации коммерческих ферментных препаратов: «Целлолюкс-А» («Сиббиофарм», Россия) 0–0,04 кг/кг субстрата, «Ультрафло Коре» («Novozymes A/S», Дания) 0–0,10 л/кг субстрата, «Брюзайм ВГХ» («Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A.», Польша) 0–0,20 л/кг субстрата. Оценку гидролитической способности МЭК вели по динамике накопления в реакционной смеси редуцирующих веществ (РВ). Работа выполнена при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Результаты численного моделирования зависимости концентрации ПВ от состава МЭК на основе симплекс-центрального плана представлены на рисунке.

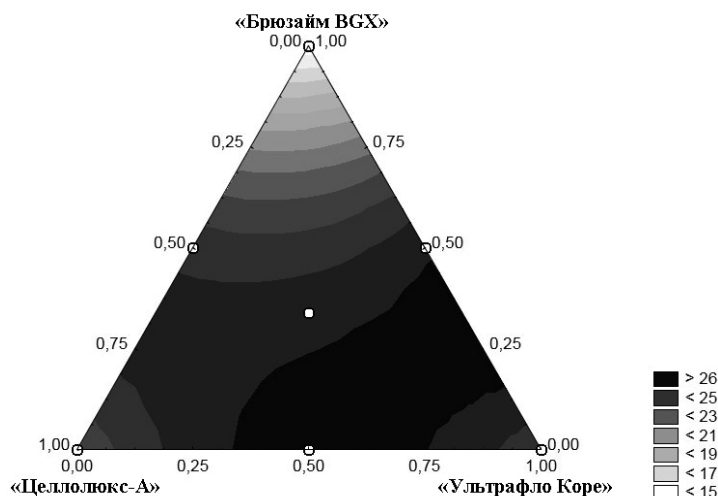


Рисунок – Влияние состава МЭК на концентрацию ПВ (г/л)

В результате решения задачи оптимизации состава МЭК методом приведенного градиента показано, что максимальная концентрация ПВ достигается при следующем соотношении ферментных препаратов: «Целлолюкс-А» – 0,018 кг/кг субстрата, «Ультрафло Коре» – 0,055 л/кг субстрата, «Брюзайм ВГХ» – 0 л/кг субстрата.

Исследование выполнено 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. Sakovich G.V., Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Aleshina L.A. Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017. Vol. 477. P. 357–359.

UDC 664.162.6:577.152

## OPTIMIZING THE COMPOSITION OF MULTI-ENZYME COCKTAIL TO PREPARE NUTRIENT BROTHS FROM CELLULOSIC FEEDSTOCKS

Mironova G.F., Kashcheyeva E.I., Skiba E.A., Kukhlenko A.A.

*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*

We have optimized the composition of a multi-enzyme cocktail based on the enzymes CelloLux-A, Ultraflo Core and BrewZyme BGX for the hydrolysis of the nitric-acid treatment product of oat hulls in order to obtain a nutrient broth intended for the biosynthesis of bacterial nanocellulose (BNC).

**Key words:** multi-enzyme cocktail; simplex centroid design; enzymatic hydrolysis; bacterial nanocellulose.

The obtention of valuable BNC from low-cost plant cellulose is among the cutting-edge solutions in the technology for this most promising material. Nutrient broths being prepared from cellulosic resources are known to comprise inhibitors of microbiological synthesis; therefore, the fundamental engineering of each process unit operation is extremely crucial [1, 2]. One of the key unit operation in producing BNC is the enzymatic hydrolysis of a chemically pretreated feedstock and its transformation into a nutrient broth. The unit operation should ensure a maximum yield of sugars for a short time. This research aimed to optimize the composition of the multi-enzyme cocktail exhibiting a cellulase-glucanase activity.

The substrate for enzymatic hydrolysis was a product obtained by the nitric-acid treatment of oat hulls at a pilot

production site of IPCET SB RAS. The enzymatic hydrolysis of the substrate was run in sealed 500-cm<sup>3</sup> Erlenmeyer flasks in 0.1 M acetate buffer (pH 4.6); 30 g/L substrate loading; 46±2 °C; 120 rpm stirring; 72 h process time. Concentrations of the commercial enzymes in the multi-enzyme cocktail were varied: CelloLux-A (Sibbiopharm, Russia) 0–0.04 kg/kg substrate, Ultraflo Core (Novozymes A/S, Denmark) 0–0.10 L/kg substrate, BrewZyme BGX (Polfa Tarchomin Pharmaceutical Works S.A., Poland) 0–0.20 L/kg substrate.

The hydrolytic capability of the multi-enzyme cocktail was evaluated against the accumulation dynamics of reducing sugars in the reaction mixture. The research was conducted with equipment of the Biysk Regional Center of Collective Use of the SB RAS (IPCET SB RAS, Biysk).

The numerical modeling results on the relationship between the reducing sugar concentration and the multi-enzyme cocktail composition using the simplex centroid design are illustrated in the Figure.

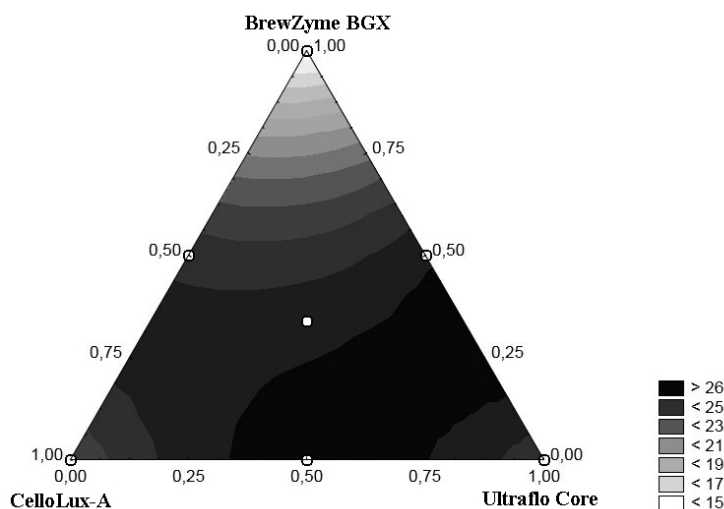


Figure – Effect of the multi-enzyme cocktail composition on reducing sugar concentration (g/L)

It was eventually found by solving the problem of optimizing the multi-enzyme cocktail composition by the reduced gradient method that the maximum concentration of reducing sugars was achieved with the following ratio of the enzymes: CelloLux-A 0.018 kg/kg substrate, Ultraflo Core 0.055 L/kg substrate, and BrewZyme BGX 0 L/kg substrate.

The research was supported by a Russian Science Foundation grant (Project # 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. Sakovich G.V., Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Aleshina L.A. Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017. Vol. 477. P. 357–359.

УДК 57.013

## ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ – ПРИРОДНЫЕ БИОРАЗРУШАЕМЫЕ ПОЛИМЕРЫ

Волова Т.Г.<sup>1,2</sup>, Жила Н.О.<sup>1,2</sup>, Киселев Е.Г.<sup>1,2</sup>, Шишацкая Е.И.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики СО РАН – обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия 660036, Красноярск, Академгородок, 50, стр.50

<sup>2</sup> Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия 660041, Красноярск, просп. Свободный, 79  
e-mail: volova45@mail.ru

Приведены данные по физико-химическим и механическим свойствам 2-х, 3-х и 4-х компонентных полигидроксиалканоев, различающихся набором и соотношением мономеров с различной длиной С-цепи. Показана возможность использования полигидроксиалканоев в качестве основы для создания долговременных и адресных сельскохозяйственных препаратов нового поколения.



**Ключевые слова:** полигидроксиалканоаты, биоразрушаемые полимеры, микробиологический синтез, структура, свойства, области применения

Возрастающие требования к охране окружающей среды и обоснованное беспокойство в связи с накоплением в биосфере отходов синтетических пластмасс актуализируют исследования и переход на биотехнологические процессы получения разрушаемых полимеров. Среди перспективных «зеленых» пластиков - полигидроксиалканоаты (ПГА), разрушаемые полиэфиры монокарбоновых кислот, синтезируемые различными микроорганизмами. ПГА – это семейство полимеров различной химической структуры, различающихся базовыми физико-химическими свойствами. Соплимерные ПГА более перспективны, так как на их основе возможно получение материалов и изделий с различными, в том числе улучшенными свойствами, по сравнению с высококристаллическим гомополимером 3-гидроксимасляной кислоты.

Исследованы физико-химические свойства (степень кристалличности, температурные и молекулярно-массовые характеристики) и механические свойства ряда ПГА различного химического состава, синтезированные на комплексном углеродном субстрате бактериями *Cupriavidus eutrophus* B10646. Двух-, 3-х и 4-х компонентные сополимерные образцы различались набором и соотношением мономеров с различной длиной С-цепи: 3-гидроксипропаноата, 4-гидроксипропаноата, 3-гидроксипантаноата, 3-гидрокси-4-метилпентаноата, диэтиленгликоля.

Сконструировано и охарактеризовано семейство форм сельскохозяйственных препаратов с использованием разрушаемых ПГА в качестве основы. В лабораторных почвенных экосистемах с модельными сорными растениями, а также в посевах культурных растений, зараженных возбудителями корневых гнилей или сорняками, показана эффективность дождевого применения разработанных пролонгированных форм препаратов, депонированных в разрушаемую основу из ПГА, что открывает перспективы для создания долговременных и адресных препаратов нового поколения с целью снижения норм внесения и неконтролируемого распространения в биосфере ксенобиотиков.

Работа выполнена при финансовой поддержке мега-гранта "Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация (Соглашение № 14.Y26.31.0023) в соответствии с Постановлением №220 Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования

UDC 57.013

## POLYHYDROXYALKANOATES – NATURAL BIODEGRADABLE POLYMERS

**Volova T.G.<sup>1,2</sup>, Zhila N.O.<sup>1,2</sup>, Kiselev E.G.<sup>1,2</sup>, Shishatskaya E.I.<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Biophysics FRC KSC SB RAS, Krasnoyarsk, Russia  
 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok 50/50

<sup>2</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia  
 660041, Krasnoyarsk, 79 Svobodnyi Ave  
 e-mail: volova45@mail.ru

Data on the physicochemical and mechanical properties of 2-, 3-, and 4-component polyhydroxyalkanoates having various set and ratio of monomers with different lengths of the C-chain are given. The possibility of polyhydroxyalkanoates using as a basis for creating long-term and targeted agricultural preparations of a new generation is shown.

**Key words:** polyhydroxyalkanoates, synthetic plastics waste, biodegradable PHAs, structure, application, physicochemical properties

Increasing requirements for environmental protection and reasonable concern in connection with the accumulation of synthetic plastics waste in the biosphere actualize research and transition to biotechnological processes for the production of degradable polymers. Among the promising «green» plastics are polyhydroxyalkanoates (PHA), degradable polyesters of monocarboxylic acids synthesized by various microorganisms. PHA is a family of polymers of various chemical structure having different basic physicochemical properties. PHA copolymers are more promising polymers, because they can be used for production of materials and articles with various properties including improved properties as compared to the highly crystalline homopolymer of 3-hydroxybutyric acid.

Physicochemical properties (degree of crystallinity, temperature and molecular mass characteristics) and mechanical properties of PHA having different chemical composition synthesized on a complex carbon substrate by *Cupriavidus eutrophus* B10646 were studied. Two, three and four component copolymer samples differed in the

set and ratio of monomers with different C-chain lengths: 3-hydroxybutyrate, 4-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxy-4-methylvalerate, diethylene glycol.

A family of agricultural preparations forms using biodegradable PHAs as a basis was constructed and characterized. In laboratory soil ecosystems with model weed plants, as well as in crops of cultivated plants infected with pathogens of root rot or weeds, the effectiveness of pre-emergence application of the developed long-term forms of pesticides deposited in PHA was shown. It opens prospects for the creation of long-term and targeted new-generation pesticides to reduce application rates and the uncontrolled spread of xenobiotics in the biosphere.

This study was financially supported by Project "Agropreparations of the new generation: a strategy of construction and realization" (Agreement No 14.Y26.31.0023) in accordance with Resolution No 220 of the Government of the Russian Federation, "On measures designed to attract leading scientists to the Russian institutions of higher learning".

УДК 579.66

## ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛУПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Макарова М.И., Воронина В.А., Суясов Н.А., Яровая О.В.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20, корп. 1  
e-mail: marina97@inbox.ru

В качестве источника сырья для микробиологической промышленности может быть использован природный газ. В работе рассмотрены варианты комплексной переработки с целью получения биологически активных веществ кормового и медицинского назначения.

**Ключевые слова:** метанооксиляющие микроорганизмы, переработка биомассы, биотехнология, кормовая биомасса, метан

В настоящее время одной из остро стоящих проблем является дефицит кормового белка. Потребность в белке столь велика, что ученые всего мира не перестают искать новые источники сырья для его получения, в том числе путем микробиологического синтеза. Особый интерес представляет природный газ, который состоит в основном из самого простого по строению и самого легкого углеводорода — метана. Интерес к подобным процессам обусловлен значительными залежами природного сырья и низкой себестоимостью его добычи. На основе природного газа с использованием метанотрофных аэробных бактерий возможно производство высокобелковой биомассы.

Получаемая из метана кормовая бактериальная в среднем содержит (% по массе): протеин — 70-75; липиды — 7-8; зола — до 10; нуклеиновые кислоты — 8-10. Кроме того, в ней содержатся различные ценные биологически активные вещества: полисахариды, каротиноиды, витамины группы В и др. [1,2].

Согласно требованиям к кормовым добавкам, высокое содержание нуклеиновых кислот, присутствующих в биомассе метанооксиляющих микроорганизмов, лимитирует ее практическое использование в качестве кормовой добавки. С целью более эффективного использования бактериальной биомассы целесообразным является извлечение нуклеиновых кислот. [3]

Выделенные нуклеиновые кислоты могут быть использованы для изготовления различных препаратов, которые широко применяются в медицине, в частности при лечении онкологических заболеваний. Лечебный эффект достигается за счет нормализации метаболизма в тканях, находящихся в экстремальных условиях. [4]

В настоящее время на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева ведется исследование, направленное на получение биологически активных веществ различной природы в ходе комплексной переработки биомассы метанооксиляющих микроорганизмов. Показано, что с использованием таких методов, как экстракция растворами минеральных солей, ультрафильтрационное разделение с применением мембран с отсекаемыми молекулярными массами от 10 до 100 кДа, осаждение и переосаждение, возможно выделение отдельных биологически активных веществ. При комбинировании данных методов удается выделить субстанцию нуклеиновых кислот с содержанием ДНК — 2,44 г/л и РНК — 2,57 г/л. Предварительные исследования показали, что данная субстанция может быть использована в дальнейшей переработке для получения отдельных нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований.

Биомассу, полученную после извлечения из нее нуклеиновых кислот с содержанием сырого протеи-

на – 67,5% от СВ, после сушки можно использовать в качестве высокобелковой добавки в корм крупного рогатого скота.

Литература:

1. Гальченко В.Ф. *Метанотрофные бактерии*. М.: изд. ГЕОС, 2001, 500с.
2. Исследование влияния внеклеточных метаболитов на развитие метанооксиляющей культуры *methylococcus capsulatus* / Е. С. Бабусенко, Г. И. Эль-Регистан, Н. Б. Градова и др. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 1992. – Т. 28, № 5. – С. 753–759.
3. Градова Н. Б. *Микробиологические основы производства кормового белка* // *Получение и применение кормового микробного белка*. – 1989. – С. 160–177.
4. Васильева И. Н., Беспалов В. Г. Роль внеклеточной ДНК в возникновении и развитии злокачественных опухолей и возможности ее использования в диагностике и лечении онкологических заболеваний // *Вопросы онкологии*. – 2013. – Т. 59. – №. 6. – С. 673-681.

UDC 579.66

## OBTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE SEMI-FINISHED PRODUCTS BASED ON BACTERIAL BIOMASS OF METHANE OXIDIZING MICROORGANISMS

Makarova M.I., Voronina V.A., Suyasov N.A., Yarovaya O.V.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia  
 125480, Moscow, ul. Geroev Panfilovtsev, d. 20, korp. 1  
 e-mail: marina97@inbox.ru

Natural gas can be used as a raw material in microbiological industry. This study describes the complex processing approaches employed to obtain biologically active substances used for feeding and medical purposes.

**Key words:** methane oxidizing microorganisms, biomass processing, biotechnology, feeding biomass, methane

Nowadays feed protein deficiency is a very crucial issue. Protein is so much needed that scientists worldwide keep looking for the new sources of raw materials to obtain the protein by means of microbiological synthesis among the other methods. Natural gas is especially interesting in this sense as it mainly consists of the lightest hydrocarbon with the simplest structure, that is, the methane. Such processes are interesting due to significant deposits of natural raw materials and low extraction costs. High-protein biomass can be produced using natural gas and employing methanotrophic aerobic bacteria.

Obtained from methane, feeding bacterial mass contains the following substances on the average (in % by weight): 70 to 75% of protein; 7 to 8% of lipids; up to 10% of ash; 8 to 10% of nucleic acids. In addition, it also contains different valuable biologically active substances such as polysaccharides, carotenoids, B vitamins etc. [1,2].

According to requirements for feeding supplements, high content of the nucleic acids, which are present in the biomass of methane oxidizing microorganisms, limits its practical use as a feeding supplement. To promote more efficient use of bacterial biomass, it is wise to extract nucleic acids [3].

Allocated nucleic acids can be used to make different drugs, which are widely used in medical industry, especially for treating cancerous diseases. Health-promoting benefits are achieved by normalization of metabolism in the tissues under extreme circumstances [4].

Recently, biotechnology faculty at the D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia conducts research aimed at obtaining of biologically active substances of different origin by means of complex processing of the biomass of methane oxidizing microorganisms. It has been proven that using such methods as extraction via mineral salt solutions, ultrafiltration with use of membranes with isolated molecular masses from 10 up to 100 kDa, deposition and redeposition, it is possible to isolate biologically active substances. Combining such methods, it is possible to isolate substance of nucleic acids with DNA content of 2,44 g/l and RNA of 2,57 g/l. Preliminary research has shown that given substance can be used to promote further processing in order to obtain certain nucleotides, nucleosides and basic nitrogens.

Once dried, biomass, which is obtained upon extraction of nucleic acids with raw protein content of 67,5% from DS, can be used as a high-protein feeding supplement for cattle.

References:

1. Gal'chenko V.F. *Metanotrofnye bakterii*. M.: izd. GEOS, 2001, 500s.
2. Issledovanie vlijaniya vnekletocnyh metabolitov na razvitie metanokisljajushhej kul'tury *methylococcus capsulatus* / E. S. Babusenko, G. I. Jel'-Registan, N. B. Gradova i dr. // *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*. – 1992. – Т. 28, № 5. – S. 753–759.
3. Gradova N. B. *Mikrobiologicheskie osnovy proizvodstva kormovogo belka* // *Poluchenie i primenenie kormovogo mikrobnogo belka*. – 1989. – S. 160–177.

4. Vasil'eva I. N., Bespalov V. G. Rol' vnekletochnoj DNK v vznikovenii i razviti zlokachestvennyh opuholej i vozmozhnosti ee ispol'zovaniya v diagnostike i lechenii onkologicheskikh zabolevanij //Voprosy onkologii. – 2013. – T. 59. – №. 6. – S. 673-681.

УДК 604.2:547.458; 674.812.2.

## **РАЗРАБОТКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И КОНСТРУКЦИОННЫХ БИОКОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ МИКРОБНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ**

**Ревин В.В., Лияськина Е.В., Атыкян Н.А., Пестов Н.А., Новокупцев Н.В.**

Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва, Саранск, Россия,  
430005, Саранск, ул. Большевикская, д. 68  
e-mail: revinvv2010@yandex.ru

Получены функциональные материалы на основе бактериальной целлюлозы: аэрогели и биоконпозиты медицинского и технического назначения. Разработаны конструкционные биоконпозитионные материалы с применением в качестве связующего полисахарида левана. Изучены их структура, физико-химические и физико-механические свойства.

**Ключевые слова:** биоконпозитионные материалы, микробные полисахариды, бактериальная целлюлоза, леван

В настоящее время производство микробных полисахаридов является одной из перспективных областей биотехнологии. Широкое применение нашли микробные полисахариды - ксантан, альгинат, леван, декстран, бактериальная целлюлоза и др. [1]. Они используются в медицине, фармацевтической, пищевой, химической и текстильной промышленности, в гидрометаллургии, при добыче нефти и в ряде других областей народного хозяйства. Микробные полисахариды являются перспективным источником получения различных биоконпозитионных материалов широчайшего спектра, свойств и назначений. Особое внимание исследователей привлекает бактериальная целлюлоза (БЦ), которая обладает такими уникальными свойствами как высокая механическая прочность, сорбционная способность, биологическая совместимость и т. д. [2]. Благодаря своим уникальным свойствам БЦ является перспективным материалом для промышленности и техники, открывая новые горизонты для нанотехнологии. Она является перспективным источником получения нанокристаллической целлюлозы и биоконпозитионных материалов. Еще одним перспективным микробным полисахаридом является леван. Он имеет большой потенциал использования в пищевой, косметической, фармацевтической и химической промышленности. Леван обладает высокими адгезивными свойствами и может использоваться для производства экологически безопасных клеев и биопластиков.

На кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии Мордовского государственного университета длительное время проводятся исследования в области бактериальных экзополисахаридов [1,2]. Получены высокопродуктивные штаммы бактерий *Xanthomonas campestris*, образующие ксантан в количестве 26 – 28 г/л, *Leuconostoc mesenteroides*, накапливающие декстран в количестве 40-50 г/л, *Gluconacetobacter sucrofermentans*, синтезирующие БЦ в количестве 7 – 8 г/л [3]. Разработаны технологии производства ксантиана, декстриана, левана и БЦ с использованием отходов промышленности [4,5]. Получены новые функциональные материалы на основе БЦ: аэрогели с низкой теплопроводностью и биоконпозиты с антисептическими свойствами [6-8]. Разработаны белково-полисахаридные биоразлагаемые пленки [9]. Получены прессованные композиционные материалы из отходов древесины с добавлением в качестве связующего левана [10-12], биомассы дрожжей и БЦ [13]. Изучены структура, физико-химические и физико-механические свойства полученных биоконпозитионных материалов.

Литература:

1. Лияськина Е.В., Ревин В.В., Грошев М.В., Лияськин Ю.К. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов. - Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2010. 120 с.
2. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А. Получение бактериальной целлюлозы и наноконпозитионных материалов. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2014. 128 с.
3. Патент РФ № 2523606, 12.03.2013.
4. Патент РФ № 2536973, 6.12.2013.
5. Патент РФ № 2536257, 17.06.13.

6. Патент РФ № 2564567, 26.11.2014.
7. Liyaskina E., Revin V., Paramonova E., Nazarkina M., Pestov N., Revina N., Kolesnikova S. *Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing*// *Journal of Physics: Conference Series*. 2017. Vol. 784. № 1. P. 012034.
8. Zakharov A.G., Voronova M.I., Matveeva I.S., Isaeva D.A., Kevina E.V., Kotina E.F., Revin V.V. *Nanocrystalline cellulose and materials based on it*// *Fibre chemistry*. 2015. Vol. 47. № 4. P. 278-283
9. Патент РФ № 2604223, 04.06.2015.
10. Патент РФ № 2574211, 26.11.2014.
11. Патент РФ № 2598911, 15.06.2015.
12. Revin V., Novokuptsev N., Kadimaliev D. *Preparation of biocomposites using sawdust and lignosulfonate with a culture liquid of levan producer Azotobacter vinelandii as a bonding agent*. *Bioresources*. 2016. Vol. 11. № 2. P. 3244-3258.
13. Kadimaliev D., Kezina E., Telyatnik V., Revin V., Parchaykina O., Syusin I. *Residual Brewer's Yeast Biomass and Bacterial Cellulose as an Alternative to Phenol Formaldehyde Toxic Binders in Production of Pressed Materials from Waste Wood*// *BioResources*. 2014. Vol. 10. № 1. P. 1644-1656.

UDC 604.2:547.458; 674.812.2.

## DEVELOPMENT OF PROMISING FUNCTIONAL AND CONSTRUCTIONAL BIOCOMPOSITE MATERIALS ON THE BASIS OF MICROBIAL POLYSACCHARIDES

**Revin V.V., Liyaskina E.V., Atykhan N.A., Pestov N.A., Novokuptsev N.V.**

*National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia  
 68 Bolshevistskaya Str., Saransk 430005, Russia  
 e-mail: revinvv2010@yandex.ru*

Functional materials based on bacterial cellulose were obtained: aerogels and biocomposites for medical and technical purposes. Wood-fiber biocomposite materials were prepared using the polysaccharide levan as a binder. Their structure, physico-chemical and physical-mechanical properties were studied.

**Key words:** biocomposite materials, microbial polysaccharides, bacterial cellulose, levan.

Currently, production of microbial polysaccharides is one of the most promising areas of biotechnology. Such microbial polysaccharides as xanthan, alginate, levan, dextran, bacterial cellulose and other are widely applied [1]. They are used in medicine, the pharmaceutical, food, chemical and textile industry, in hydrometallurgy, the equipment, at oil production and in some other fields of the national economy. Microbial polysaccharides are a perspective source of receiving various biocomposite materials of the widest range, properties and applications. The special attention of researchers is attracted by the bacterial cellulose (BC) which has such unique properties as the high mechanical durability, sorption ability, biological compatibility, etc. [2]. Due to the unique properties the BC is perspective material for the industry and the equipment, opening the new horizons for nanotechnology. It is a perspective source of receiving cellulose nanocrystals and biocomposite materials. Levan is another perspective microbial polysaccharide. It has high potential of use in food, cosmetic, pharmaceutical and chemical industry. Levan has high adhesive properties and can be used for production of ecologically friendly glues and biocomposites.

The researches in the field of bacterial exopolysaccharides are conducted for a long time at the department of biotechnology, bioengineering and biochemistry of the Mordovian state University [1, 2]. The high-producing strains were received. *Xanthomonas campestris* synthesizes 26 – 28 g xanthan per 1 litter of culture medium. *Leuconostoc mesenteroides* produces 40-50 g of dextran per 1 litter of culture medium. *Gluconacetobacter sucrofermentans* produces bacterial cellulose in amount of 7 – 8 g/l [3]. The technologies for production of xanthan, dextran, levan, and bacterial cellulose with the use of industry waste have been developed [4,5]. New functional materials based on BC have been obtained: aerogels with low thermal conductivity and biocomposites with antiseptic properties [6-8]. The technologies for production of protein-polysaccharide biodegradable films also have been developed [9]. The pressed composite materials from waste of wood with addition of levan as binder [10-12], yeast biomass and bacterial cellulose [13] were obtained. The structure, physico-chemical and physico-mechanical properties of the biocomposite materials were studied.

### References:

1. Liyaskina E.V., Revin V.V., Groshev M.V., Liyaskin U.K. *Biotechnology of bacterial exopolysaccharides*. – Saransk: Mordov. Univer. Publ., 2010. 120 c.
2. Revin V.V., Liyaskina E.V., Pestov N.A. *Production of bacterial cellulose and nanocomposite materials*. – Saransk: Mordov. Univer. Publ., 2014. 128 c.

3. Patent RU № 2523606, 12.03.2013.
4. Patent RU № 2536973, 6.12.2013.
5. Patent RU № 2536257, 17.06.13.
6. Patent RU № 2564567, 26.11.2014.
7. Liyaskina E., Revin V., Paramonova E., Nazarkina M., Pestov N., Revina N., Kolesnikova S. Nanomaterials from bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing// *Journal of Physics: Conference Series*. 2017. Vol. 784. № 1. P. 012034.
8. Zakharov A.G., Voronova M.I., Matveeva I.S., Isaeva D.A., Kevina E.V., Kotina E.F., Revin V.V. Nanocrystalline cellulose and materials based on it // *Fibre chemistry*. 2015. Vol. 47. № 4. P. 278-283
9. Patent RU № 2604223, 04.06.2015.
10. Patent RU № 2574211, 26.11.2014.
11. Patent RU № 2598911, 15.06.2015.
12. Revin V., Novokuptsev N., Kadimaliev D. Preparation of biocomposites using sawdust and lignosulfonate with a culture liquid of levan producer *Azotobacter vinelandii* as a bonding agent. *Bioresources*. 2016. Vol. 11. № 2. P. 3244-3258.
13. Kadimaliev D., Kezina E., Telyatnik V., Revin V., Parchaykina O., Syusin I. Residual Brewer's Yeast Biomass and Bacterial Cellulose as an Alternative to Phenol Formaldehyde Toxic Binders in Production of Pressed Materials from Waste Wood // *BioResources*. 2014. Vol. 10. № 1. P. 1644-1656.

УДК 581. 522.4

## РЕГУЛЯЦИЯ РОСТОВЫХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАСТЕНИЙ РАПСА СЕЛЕКТИВНЫМ СВЕТОМ НА ФОНЕ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ МЕДИ В СРЕДЕ

Данилова Е.Д., Коломейчук Л.В., Ефимова М.В.

Национальные исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия  
634060, г. Томск, пр. Ленина, 36.  
E-mail: nusy.l.d@gmail.com

Показано, что устойчивость растений к избыточному содержанию ионов меди определяется как отсутствием или наличием света, так и его спектральным составом.

**Ключевые слова:** Brassica napus, ионы меди, устойчивость, селективный свет.

Возрастающая техногенная нагрузка человека на окружающую среду является одной из ключевых проблем современной биологии. Среди многочисленных загрязнителей наиболее токсичными, после пестицидов, считаются тяжелые металлы. Повышенная концентрация ионов тяжелых металлов, представляет большую опасность, как для человека, так и для природных и сельскохозяйственных экосистем (Ефимова и др., 2017). Возникает необходимость повышения стрессоустойчивости растений максимально эффективным и экологически безопасным способом. Одним из возможных способов регуляции механизмов устойчивости растений к действию абиотических факторов является свет разного спектрального состава.

В нашем исследовании оценивали эффект  $\text{CuSO}_4$  (0, 10 и 25 мкМ) на ростовые (длина стебля и длина корня) и физиологические показатели (осмотический потенциал клеточного экссудата, перекисное окисление липидов) 7-суточных проростков Brassica napus, выращенных в темноте, на белом, синем, зеленом и красном свету.

Осмотический потенциал клеточного экссудата определяли на криоскопическом осмометре Osmomat 030 ("Gonotec", Германия). Интенсивность ПОЛ оценивали спектрофотометрическим методом (Buege, Aust, 1978).

Нами показано, что повышенную чувствительность к действию ионов меди (25 мкМ) проявляли корни этиолированных проростков рапса; их длина уменьшалась примерно в 2.5 раза относительно контрольного варианта.

Одним из последствий действия тяжелых металлов на растения рапса является окислительный стресс, связанный с нарушениями структуры мембран, процессов фотосинтеза и дыхания (Gill, Tuteja, 2010). Для оценки степени окислительных повреждений в семядолях рапса была изучена динамика содержания малонового диальдегида (МДА). Выявлено, что концентрация МДА в этиолированных проростках была в два раза ниже, чем у растений, выращенных в иных световых условиях. Однако, стоит отметить, что величина данного показателя у растений на зеленом свету была незначительно выше, чем в темноте.

Для поддержания оптимального водного статуса тканей растений при действии тяжелых металлов особенно важным является понижение их осмотического потенциала. В семядолях этиолированных проростков *Brassica napus* в отсутствие ионов меди величина осмотического потенциала составляла -0,58 МПа, на свету данный параметр был выше почти на 20 %. Добавление  $\text{CuSO}_4$  (10 мкМ) в питательную среду снижало анализируемый показатель на 10-15 % вне зависимости от условий освещения. Увеличение концентрации ионов меди до 25 мкМ, прогнозируемо, негативно отразилось на величине осмотического потенциала. Наибольшее снижение показателя отмечено у проростков, выращенных в условиях темноты, а наименьшее - на синем и зеленом свету.

Таким образом, нами впервые показано, что величина осмотического потенциала клеточного экссудата и динамика содержания малонового диальдегида в семядолях проростков *Brassica napus* на фоне действия  $\text{CuSO}_4$  определялась не только наличием или отсутствием освещения, но и зависела от его спектрального состава. Преобладание коротко- и средневолновой области спектра можно использовать для повышения устойчивости растений к избыточным концентрациям ионов меди.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 16-04-01071-а «Механизмы защитного действия мелатонина у растений в условиях техногенного стресса».

UDC 581. 522.4

## REGULATION OF GROWTH AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF RAPE PLANTS BY THE SELECTIVE LIGHT UNDER COPPER STRESS CONDITIONS

Danilova E.D., Kolomeichuk L.V., Efimova M.V.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia  
 634060, Tomsk, Lenin Ave., 36.  
 E-mail: nusy.l.d@gmail.com

It was showed, that the plant tolerance to a toxic copper concentration dependence on presence or absence of light, and also spectral quantity.

**Key words:** *Brassica napus*, copper ions, selective light.

Increasing human impact on the environment situation is one of the key problems of modern biology. Among the many most toxic contaminants, after pesticides are considered heavy metals. High concentration of heavy metal ions, is of a great danger for humans and agricultural ecosystems (Efimova et al., 2017). There is a need to improve the stress tolerance of plants by the most efficient and friendly environmental ways. One of the possible pathways for the regulative of the plant resistance mechanisms to the abiotic factors is a light with different spectral characteristics.

In our study has been evaluated the effect of  $\text{CuSO}_4$  (0, 10 and 25  $\mu\text{m}$ ) to the growth (stem length and root length) and physiological parameters (osmotic potential of the cell exudate, lipid peroxidation) 7-day-old *Brassica napus* seedlings grown in the dark, white, blue, green and red light.

The osmotic potential of the cell exudate was determined by a cryoscopic Osmomat 030 osmometer ("Gonotec", Germany). The intensity of lipid peroxidation was evaluated spectrophotometrically (Buege, Aust, 1978).

We demonstrated that the increased sensitivity to action of copper ions (25  $\mu\text{m}$ ) appeared the roots of etiolated seedlings of rape; their length was decreased by about 2.5 times compared to the control variant.

One consequence of the effect of heavy metals on the rape seed oxidative stress is associated with impairment of membrane structure, processes of photosynthesis and its respiration (Gill, Tuteja, 2010). To assess the extent of oxidative damage in cotyledons of canola were investigated dynamics of the content of malon dialdehyde (MDA). It was found that the concentration of MDA in etiolated seedlings was two times lower than in plants grown under other light conditions. However, it should be noted that the value of this indicator in plants under green light condition were slightly higher than in darkness. For maintain of optimal water status for plant tissues under the heavy metal stress, it is especially important to decrease its osmotic potential. The parameter of osmotic potential in etiolated cotyledons of *Brassica napus* in the absence of copper stress was 0.58 MPa, but under light, it was higher by almost 20%. The action of copper stress (10  $\mu\text{m}$ ) under light condition was induce the diminished of osmotic potential to 10-15% compared with the dark. The increase of the copper concentration up to 25  $\mu\text{m}$ , predicted, to lower its. The greatest decline was observed in etiolate seedlings and least for blue and green light.

Thus, we have shown for the first time that the value of the osmotic potential of the cell exudate and dynamics of the content of malon dialdehyde in the cotyledons of *Brassica napus* seedlings on the background of  $\text{CuSO}_4$  was

determined not only by the presence or by absence of light, but also depended on its spectral composition. The predominance of short and medium wave region of the FAR can be used to increase of plant tolerance to excess concentrations of copper ions.

The investigation was performed with the financial support by the Russian Fundamental Research Foundation (project no16-04-01071-a) "Mechanisms of protective action of melatonin in plants under conditions of technogenic stress".

*References:*

1. Efimova M.V., Golovatskaya I.F., Kolomeichuk L.V. et al. // Resistance to the action of copper ions of early ripening varieties *Solanum tuberosum* L.: Collection of reports IX International Congress. "Biotechnology: state and development prospects" (Moscow, November 20-22, 2017). - Moscow, 2017. – Vol. 1. P. 110-112.
2. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods in Enzymology*. 1978. Vol. 52. P. 302-310.
3. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010. Vol. 48. P. 909-930.

УДК 663.1

## **СИСТЕМА ПЕРЕРАБОТКИ ОТХОДОВ АГРОПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА В ГИДРОЛИЗАТЫ КАК КОМПОНЕНТЫ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВАХ**

**Понкратов А.С., Валева Р.Т., Нуретдинова Э.И., Шурбина М.Ю., Понкратова С.А., Нуртдинов Р.М.**

*Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия  
420015 г. Казань, ул. Карла Маркса, д.68  
e-mail: valrt2008@rambler.ru*

Ведутся экспериментальные исследования по оценке возможности использования гидролизатов на основе отходов агропромышленного комплекса как компонентов питательной среды при получении биоэтанола и других ценных биотехнологических продуктов.

**Ключевые слова:** гидролизаты, вторичные ресурсы, культивирование, топливо.

В связи со значительным объемом промышленной переработки различного сырья растительного происхождения на перерабатывающих предприятиях агропромышленного комплекса образуется огромное количество ценных и пригодных для дальнейшей переработки вторичных сырьевых ресурсов. Для сохранения экологической обстановки, для более полной утилизации отходов агропромышленного комплекса, в последние годы индустриально развитые страны уделяют все большее внимание производству спирта, полученному путем переработки отходов растительного сырья. Для расширения сырьевой базы производства спирта привлекаются нетрадиционные виды сырья – отходы перерабатывающих отраслей агропромышленного комплекса.

В лаборатории инженерных проблем биотехнологии КНИТУ ведутся экспериментальные исследования по оценке возможности использования гидролизатов на основе отходов агропромышленного комплекса – крахмало- и целлюлозосодержащего растительного сырья как компонентов питательной среды при получении биоэтанола и других ценных биотехнологических продуктов.

Оценка биологической доброкачественности полученных гидролизатов с содержанием редуцирующих веществ от 3 до 5% масс. проводится на основе культивирования спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* таких рас как, XII, Y-717, Y-1986 в шейкере-инкубаторе Kuhner ISF1-X при температуре 29-30°C в течение 24 часов на качалочных колбах объемом 750мл и рабочим объемом 150мл. Анализ таких параметров как активная кислотность, редуцирующих веществ, прирост оптической плотности и клеток проводится через каждые 2 часа. Прирост биомассы от начала засева и до завершения процессов культивирования на фильтрованных средах с гидролизатами пшеничной соломы, кукурузных кочерыжек в среднем составляет более 1,2 ед. экстинкции при длине волны 590нм и толщине кюветы 10,07мм.

Полученные экспериментальных данные исследований свидетельствуют о возможности использования дешевых и перспективных возобновляемых сырьевых источников в виде отходов агропромышленного комплекса в качестве углеводного питания в процессах культивирования спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с дальнейшим получением биотоплив и других ценных биотехнологических продуктов.



Литература:

1. Валеева Р.Т., Понкратов А.С., Мухачев С.Г., Ананьева О.В., Нуртдинов Р.М., Емельянов В.М. Солома как перспективное сырье для биотехнологических производств. Казан. нац. исслед. технол. ун-т. — Казань : Изд-во КНИТУ, 2016. — 144 с.
2. Федорова О.В., Понкратова С.А., Валеева Р.Т., Исламгулов И.Р. Питательные среды в производствах медицинских и ветеринарных препаратов// Вестник Казанского Технологического университета. — 2017. — Т. 20, № 4. — С. 130-133.
3. Валеева Р.Т., Нуретдинова Э.И., Понкратов А.С., Ананьева О.В., Шурбина М.Ю. Оценка гидролизатов свежесквашенного жома как компонентов питательных сред для культивирования спиртовых дрожжей// Вестник Казанского Технологического университета. — 2016. — Т. 19, № 13. — С. 161-163.

UDC 663.1

## WASTE PROCESSING SYSTEM OF AGRO-INDUSTRIAL COMPLEX IN HYDROLYSATES AS COMPONENTS OF NUTRIENT ENVIRONMENT IN BIOTECHNOLOGY PRODUCTION

**Ponkratov A.S., Ananyeva O.V., Ponkratova S.A., Valeeva R.T., Nuretdinova E.I., Shurbina M.Yu.**

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation  
 420015, Kazan, ul. Karl Marx, 68  
 e-mail: valrt2008@rambler.ru

Experimental studies are under way to assess the possibility of using hydrolysates based on waste from the agro-industrial complex as components of the nutrient medium in the production of bioethanol and other valuable biotechnological products.

**Key words:** hydrolysates, secondary raw materials, cultivation, fuel.

Due to the considerable volume of industrial processing of various vegetable raw materials, a large number of valuable secondary raw materials, which are valuable and suitable for further processing, are formed at the processing enterprises of the agro-industrial complex. To preserve the ecological situation, for more complete utilization of agricultural waste, in recent years, industrialized countries are paying ever more attention to the production of alcohol obtained by recycling vegetable waste. To expand the raw-material base of bioethanol production, non-traditional types of raw materials are attracted - waste from the processing branches of the agro-industrial complex.

In the Laboratory of Engineering Problems of Biotechnology, KNITU, experimental studies are under way to evaluate the possibility of using hydrolysates based on waste from the agro-industrial complex-starch and cellulose-containing plant raw materials as components of the nutrient medium for the production of bioethanol and other valuable biotechnological products.

Evaluation of the biological purity of the obtained hydrolysates with a content of reducing substances from 3 to 5% by weight. It is carried out on the basis of cultivation of alcohol yeast *Saccharomyces cerevisiae* of races such as XII, Y-717, Y-1986 in a Kuhner ISF1-X incubator incubator at a temperature of 29-30 ° C for 24 hours on 750ml shake flasks with a working volume of 150 ml. Analysis of such parameters as active acidity, reducing substances, increase in optical density and cells is carried out every 2 hours. The growth of biomass from the beginning of seeding and to the completion of cultivation on filtered media with hydrolysates of wheat straw, corn cobs on average is more than 1.2 units. Extinction at a wavelength of 590 nm and a cell thickness of 10.07mm.

The experimental data obtained show that it is possible to use cheap and promising renewable sources of raw materials in the form of agro-industrial waste as carbohydrate nutrition in the processes of cultivation of alcoholic yeast *Saccharomyces cerevisiae* with further production of biofuels and other valuable biotechnological products.

References:

1. Valeeva R. T., Ponkratov A. S., Mukhachev S. G., Ananyeva O. V., Nurtudinov R. M., Emelyanov V. M. Straw as a promising raw material for biotechnological productions. KNRTU. Kazan: Publishing house KNITU, 2016. - 144 p.
2. Fedorova O. V., Ponkratova S. A., Valeeva R. T., Islamgulov I. R. Nutrient media in the production of medical and veterinary drugs // Bulletin of the Kazan Technological University. - 2017. - Vol. 20, No. 4. - P. 130-133.
3. Valeeva R. T., Nuretdinova E. I., Ponkratov A. S., Ananyeva O. V., Shurbina M. Yu. Evaluation of hydrodizates of beet pulp as components of nutrient media for cultivation of alcohol yeast // Bulletin of Kazan Technological University. - 2016. - T. 19, No. 13. - P. 161-163.

УДК 57.033

## СКРИНИНГ И СРАВНИТЕЛЬНОЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ВЫСОКОЛИПИДНЫХ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СТОЧНЫХ ВОДАХ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОТОПЛИВА

Пилигаев А.В.<sup>1</sup>, Сорокина К.Н.<sup>1,2</sup>, Самойлова Ю.В.<sup>1</sup>, Пармон В.Н.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, г. Новосибирск, Россия  
Адрес для переписки: пр. академика Лаврентьева 5, Новосибирск, Россия, 630090  
e-mail: piligaev@catalysis.ru

Проведено исследование характеристик роста и накопления липидов штаммов микроводорослей при их культивировании на бытовых сточных водах. Выявлены штаммы с высоким содержанием липидов при культивировании на сточных водах, которые пригодны для переработки в биодизельное топливо. Анализ метаболических изменений выбранных штаммов показал значительное увеличение внутриклеточной концентрации сахарозы при накоплении липидов.

**Ключевые слова:** микроводоросли, биотопливо, липиды, сточные воды

Микроводоросли рассматриваются как один из наиболее перспективных источников возобновляемой высоколипидной биомассы для получения биотоплива. Использование муниципальных сточных вод как субстрата для культивирования позволяет значительно снизить затраты на получение биомассы и увеличить эффективность существующих технологий переработки отходов с получением ценных побочных продуктов. Целью данной работы являлся скрининг свойств штаммов микроводорослей и анализ изменений их метаболизма при культивировании на муниципальных сточных водах для выявления перспективных штаммов с высоким содержанием липидов, пригодных для получения биодизельного топлива.

В работе проведено исследование свойств 15 штаммов микроводорослей, выделенных из природных источников, при миксотрофном культивировании на сточных водах очистных сооружений г. Новосибирска. Филогенетический анализ на основе гена 18S rPHK выявил принадлежность выделенных штаммов к родам *Micractinium*, *Chlorella*, *Parachlorella*, *Scenedesmus* и *Desmodesmus*. По результатам флуоресцентного анализа с красителем Nile Red выявлено, что три штамма *Micractinium* sp. IC-44, *Micractinium* sp. IC-76 и *Chlorella sorokiniana* IC-62 в стационарной фазе роста наиболее эффективно продуцировали нейтральные липиды. Наилучшей способностью к удалению из среды загрязнителей и оптимальным составом биомассы обладал штамм *Micractinium* sp. IC-76. Продуктивность его биомассы составила 37,2±4.1 мг л<sup>-1</sup> день<sup>-1</sup>, содержание липидов - 36,3±0,1% от сухого веса, а общее содержание насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот - 71,9%. Максимальная эффективность удаления азота (N-NH<sub>4</sub>), фосфора (P-PO<sub>4</sub>) и ХПК из среды составила 96,4, 77,8, и 65,8% соответственно, что делает штамм *Micractinium* sp. IC-76 потенциально применимым для использования в очистке муниципальных сточных вод и получения биодизельного топлива высокого качества.

Также в работе проведено сравнительное ГХ/МС метаболическое профилирование липид-продуцирующих штаммов микроводорослей рода *Chlorella* и *Micractinium*. Выявлены существенные отличия в метаболизме близкородственных штаммов в фазах роста, отличающиеся содержанием липидов. Показано значительное увеличение содержания метаболитов углеводного обмена, в том числе десятикратное увеличение внутриклеточной концентрации сахарозы у высоколипидного штамма *Micractinium* sp. IC-76 в стационарной фазе роста в сравнении с другими исследованными штаммами. Изучение физиологии синтеза нейтральных липидов у перспективных штаммов-продуцентов имеет большое значение для направленного улучшения их метаболизма в пользу увеличения продукции липидов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-73-30032).

UDC 57.033

## SCREENING AND COMPARATIVE METABOLIC PROFILING OF HIGH LIPID STRAINS OF MICROALGAE DURING CULTIVATION IN WASTEWATER FOR BIOFUEL PRODUCTION

Piligaev A.V.<sup>1</sup>, Sorokina K.N.<sup>1,2</sup>, Samoylova Y.V.<sup>1</sup>, Pamon V.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Borekov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Correspondence address: pr. Lavrentieva 5, Novosibirsk, Russia, 630090

E-mail: piligaev@catalysis.ru

In this study the growth and lipid accumulation of microalgae during cultivation on municipal wastewater was evaluated. Promising strains with a high lipid content and tolerant to wastewater were selected. The analysis of the metabolic features of the selected strains revealed a significant increase of intracellular concentration of sucrose during accumulation of lipids.

**Key words:** microalgae, biofuel, lipids, wastewater

Microalgae are considered as one of the most promising sources of renewable high-lipid biomass for biofuel production. The use of municipal wastewater as a substrate for cultivation can significantly reduce the costs of production of microalgal biomass and improve the efficiency of existing waste processing technologies with co-production of the valuable by-products. The aim of this study was to screen the properties of microalgae strains and analyze the changes in their metabolism during cultivation in municipal wastewater to identify prospective strains with a high lipid content suitable for biodiesel production.

Fifteen different microalgae strains, isolated from natural sources, were subjected to screening in municipal wastewater from the Novosibirsk municipal wastewater treatment facility. Phylogenetic analysis of the 18S rRNA gene revealed that the isolated strains belong to genera of *Micractinium*, *Chlorella*, *Parachlorella*, *Scenedesmus* and *Desmodesmus*. According to Nile red fluorescent analysis of neutral lipids, three microalgae strains *Micractinium* sp. IC-44, *Micractinium* sp. IC-76 and *Chlorella sorokiniana* IC-62 with the highest lipid content in stationary growth phase were selected as a promising strains. The strain *Micractinium* sp. IC-76 has the strong ability to remove contaminants from the cultivation media and has the optimal biomass composition. The strain *Micractinium* sp. IC-76 has a biomass productivity of  $37.18 \pm 4.12$  mg L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> and a lipid content of  $36.29 \pm 0.11\%$ , with a total content of saturated and monounsaturated fatty acids of 71.9%. The maximal removal efficiency of nitrogen (N-NH<sub>4</sub>), phosphorus (P-PO<sub>4</sub>) and COD was  $96.4 \pm 0.7$ ,  $77.8 \pm 5.6\%$  and  $65.8 \pm 7.0\%$ , respectively, which makes the strain *Micractinium* sp. IC-76 promising for municipal wastewater treatment and high-quality biodiesel production.

A comparative GC/MS metabolic profiling of lipid-producing microalgae strains belonging to genera *Chlorella* and *Micractinium* was also performed. Significant differences in the metabolism of closely related strains with distinct lipid content in the different were revealed in both growth phases. The strain *Micractinium* sp. IC-76 in the stationary phase of growth showed a significant difference in carbohydrate metabolism, especially a 10-fold increase in the intracellular concentration of sucrose. Studies of the metabolism of the prospective strains will help to understand the nature of metabolic shifts responsible for biomass growth and lipid accumulation and identify targets for increasing lipid yield of microalgae strains.

This work was supported by the Russian Science Foundation, grant № 17-73-30032.

УДК 579.61:577.15

## СКРИНИНГ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОИСКА ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ

Гордонова И.К., Никитина З.К.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

117216, Москва, ул. Грина, 7

igordonova777@yandex.ru

Разработан скрининг-метод для поиска продуцентов целлюлаз. Изучена целлюлолитическая активность 6 штаммов дейтеромицетов из коллекции ФГБНУ ВИЛАР. Показано, что все исследованные штаммы могут

рассматриваться в качестве перспективных продуцентов целлюлаз.

**Ключевые слова:** микромицеты, целлюлолитическая активность, скрининг-метод.

Лигноцеллюлозная биомасса является потенциальным источником дешевого сырья для получения разнообразных продуктов и топлива [1]. Ежегодно в результате фиксации солнечной энергии образуется приблизительно 4x10<sup>11</sup> тонн растительной биомассы, состоящей в основном из целлюлозы [2]. Среди большого разнообразия микроорганизмов, участвующих в биоконверсии растительного сырья, важную роль играют микроскопические грибы [3].

Целью исследования являлась разработка скрининг-метода для поиска продуцентов целлюлаз среди коллекционных штаммов микромицетов из биокolleкции ФГБНУ ВИЛАР. Использовали следующие виды микроорганизмов: *Aspergillus flavus*, *A. mangini*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *P. martensii*. Показано, что все исследованные культуры росли на агаризованных средах с частичной заменой сахарозы на различные типы целлюлозы. Визуализация зон лизиса целлюлозы с помощью окраски раствором Люголя позволила рассчитать индексы лизиса, которые изменялись в диапазоне от 1,13 (*P. martensii*) до 1,55 (*P. citrinum*). При глубинном культивировании *P. citrinum* с использованием в качестве субстрата МЦ (метилцеллюлозы)-35 в фильтрате культуральной жидкости обнаружена целлюлолитическая активность. Таким образом, разработан метод, позволяющий в дальнейшем провести скрининг коллекционных штаммов микромицетов. Значимость проводимых исследований состоит в разработке инновационных технологий получения целлюлаз на основе отечественных микроорганизмов – продуцентов.

*Литература:*

1. Скомаровский А.А., Марков А.В., Гусаков А.В. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // Прикл. биохим. и микробиология – 2006. – Т. 42, №. 6. С. 674-680.
2. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. Древесина и разлагающие ее грибы. М.: Наука, М. 2001. 264 с.
3. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Целлюлазы микроорганизмов // Прикл. биохим. микробиология – 2002. – Т. – 38, №. 4. – С. 355-373.

UDC 579.61:577.15

## SCREENING OF MICROMYCETES FOR CELLULASES PRODUCERS SEARCH

Gordonova I.K., Nikitina Z.K

Federal state scientific institution all-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, Moscow, Russia  
117216, Moscow, Green street, 7  
igordonova777@yandex.ru

Screening method for cellulases producers searching was developed. Cellulolytic activities of 6 deuteromycetes strains from the FGBNU VILAR collection were investigated. It was shown that all explored strains can be considered as promising producers of cellulases.

**Key words:** micromycetes, cellosolytic activity, screening-method.

Lignocellulosic biomass is a potential source of cheap raw material for producing of various products and fuel [1]. Every year about 4x10<sup>11</sup> tons of plant biomass consisting mainly of cellulose form as a result of the solar energy fixation [2]. Among a wide variety of microorganisms involved in bioconversion of vegetable raw materials, an important role is played by microscopic fungi [3].

The aim of the study was to develop a screening method for cellulase producers seaching among collection strains of micromycetes in FGBNU VILAR biocollecion. The following types of microorganisms: *Aspergillus flavus*, *A. mangini*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *P. martensii*. were used. It was shown that all investigated strains were grown in culture media with partial replacement of sucrose on different types of cellulose. Lysis zones of cellulose visualization with the use of Lugol's iodine solution coloring made it possible to calculate indexes of lysis, which ranged from 1,13 (*P. martensii*) to 1.55 (*P. citrinum*). The cellulolytic activity in the culture liquid filtrate was detected after submerged cultivation of *P. citrinum* with using MC (methylcellulose)-35 as substrate. Thus, the method was developed, which allows in further to screen collection strains of micromycetes. The significance of the research is developing innovative technologies of cellulases production on the basis of domestic microorganisms–producers.

## References:

1. Skomarovskiy A. A., Markov A. V., Gusakov A. V. New cellulases for efficient hydrolysis of lignocelluloses biomass // *Prikladnaja biochimija i microbiologija* – 2006. – V. 42, № 6. – P. 674-680.
2. Rabinovich M. L., Bolobova A. V., Kondrashenko V. I. Theoretical bases of wood composites biotechnology. Wood and her decomposing fungus. M.: Nauka, M. 2001. 264 p.
3. Rabinovich M. L., Melnick, M. S., Bolobova A. V. Cellulases of microorganisms. // *Prikladnaja biochimija i microbiologija* - 2002. V. 38, № 4. – P. 355-373.

УДК 544/4

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЕКТИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ ПИРОЛИЗА УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ ПРИ ОСЦИЛЛИРУЮЩЕЙ ТЕМПЕРАТУРЕ

**Быков В.И., Цыбенкова С.Б., Ломакин С.М., Варфоломеев С.Д.**

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия  
 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4  
 e-mail: vbykov@mail.ru

Проведено математическое моделирование процесса пиролиза углеродсодержащего сырья в реакторах различного типа.

**Ключевые слова:** кинетическая модель, макрокинетика, пиролиз, осциллирующая температура, трубчатый реактор, оптимальное управление, разветвленно-цепной процесс.

Пиролиз углеродсодержащего сырья является важной составной частью решения актуальной проблемы переработки отходов. Эксперименты показывают, что осуществление пиролитических процессов в осциллирующем температурном поле приводит к заметному повышению производительности установки пиролиза.

Предложена кинетическая модель процесса, отвечающая совокупности последовательно-параллельных реакций [1]. Показано, что в определенной области температур осциллирующие режимы позволяют увеличить производительность процесса пиролиза. На кинетическом этапе проектирования технологии выявлена важная роль разветвленно-цепных механизмов реакции пиролиза [2].

Предложена макрокинетическая модель пиролиза, которая позволяет получить качественные и количественные характеристики процессов переноса при реализации пиролиза углеродсодержащих материалов в установках типа реактора вытеснения [3]. Показано, что кинетический режим сохраняется в трубчатых реакторах с радиусом менее 1,5–2 см.

Сформулированы и решены задачи оптимального управления температурой процессов пиролиза в реакторах идеального вытеснения. Показано, что оптимальный температурный режим управления реактором пиролиза со шнековой подачей углеродсодержащего сырья существенно зависит от характера основных стадий кинетической схемы реакций [4].

Осуществлено математическое моделирование процесса пиролиза в трубчатом реакторе кассетного типа, с противотоком и переменного сечения [5–7]. Показано, что реализация пиролиза в трубчатом реакторе, в котором нагрев пористого углеродсодержащего сырья происходит во встречном потоке нагретого газа, может обеспечить значительную производительность процесса.

Совокупность предложенных этапов моделирования пиролитических процессов позволяет говорить о разработке теоретических основ проектирования процессов пиролиза углеродсодержащих отходов, осуществляемых в режиме осциллирующих температурных полей.

Работа поддержана РФФИ, грант №16-03-00123А (2016–2018 г.г.).

## Литература:

1. Быков В.И., Ломакин С.М., Цыбенкова С.Б., Варфоломеев С.Д. Кинетические особенности импульсного пиролиза углеродсодержащего сырья в режиме осциллирующего изменения температуры // *ДАН*. – 2015. – Т. 462, №1. – С. 52–54.
2. Быков В.И., Ломакин С.М., Цыбенкова С.Б., Варфоломеев С.Д. О роли разветвленно-цепных (автокаталитических) реакций в кинетике пиролиза углеродсодержащего сырья при осциллирующей температуре // *ДАН*. – 2016. – Т. 471, №5. – С. 552–554.
3. Быков В.И., Ломакин С.М., Цыбенкова С.Б., Варфоломеев С.Д. Макрокинетические закономерности пиролиза углеродсодержащего сырья в трубчатом реакторе // *ДАН*. – 2016. – Т. 462, №3. – С.38–41.
4. Быков В.И., Ломакин С.М., Цыбенкова С.Б., Варфоломеев С.Д. Об оптимальных температурных режимах управления процессом пиролиза углеродсодержащего сырья // *ДАН*. – 2016. – Т. 470, № 5. – С. 540–544.
5. Быков В.И., Ломакин С.М., Цыбенкова С.Б., Варфоломеев С.Д. Моделирование процесса пиролиза углеродсодержащего сырья в кассетном реакторе // *ДАН*. – 2016. – Т. 470, № 6. – С. 662-665.

6. Быков В.И., Ломакин С.М., Цыбенова С.Б., Варфоломеев С.Д. Моделирование пиролиза углеродсодержащего сырья в трубчатом реакторе с противотоком // ДАН. – 2017. – Т. 475, №5. – С. 535–538.

7. Быков В.И., Ломакин С.М., Цыбенова С.Б., Варфоломеев С.Д. Макрокинетика пиролиза углеродсодержащего сырья в трубчатом реакторе переменного сечения // ДАН. – 2017. – Т. 477, №3. – С. 304–306.

UDC 544/4

## THEORETICAL FOUNDATIONS OF THE DESIGNING OF THE PYROLYSIS PROCESS OF CARBONACEOUS FEEDSTOCK AT OSCILLATING TEMPERATURE

Bykov V.I., Tsybenova S.B., Lomakin S.M., Varfolomeev S.D.

Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia  
119334, Moscow, ul. Kosygina, 4  
e-mail: vbykov@mail.ru

Mathematical modeling of the pyrolysis process of carbonaceous feedstock in reactors of various types has been held.

**Key words:** kinetic model, macrokinetics, pyrolysis, oscillating temperature, tubular reactor, optimal control, branched-chain process

Pyrolysis of carbonaceous feedstock is an important essential part of the actual problem of recycling. Experiments show that the implementation of pyrolysis process in an oscillating temperature field leads to a noticeable increase of productivity of the pyrolysis equipment.

Kinetic model of the process, corresponding to the set of consecutive-parallel reactions has been proposed [1]. It is shown that in a certain temperature the oscillating regimes allow to increase the efficiency of the pyrolysis process. On the kinetic stage of the technology design an important role of the branched chain reaction mechanisms of the pyrolysis has been revealed [2].

Macrokinetic model of pyrolysis is proposed. It allows to obtain qualitative and quantitative characteristics of transport processes during the implementation of the pyrolysis of carbonaceous feedstock in equipments of a tubular reactor type [3]. It is shown that the kinetic regime is retained in a tubular reactor with a radius of less than 1.5–2 cm.

The problem of optimal temperature control of the pyrolysis process in a plug-flow reactor is formulated and solved. It is shown that the optimal temperature regime of the pyrolysis reactor control with screw feed of carbonaceous feedstock significantly depends on character of the main stages of kinetic scheme of reactions [4].

Mathematical modeling of pyrolysis in a tubular reactors of a multichannel type, a countercurrent and a variable cross-section was carried out [5–7]. It is shown that the implementation of pyrolysis in a tubular reactor, in which the heating of porous carbonaceous feedstock occurs in the countercurrent flow of heated gas, can provide significant productivity of process.

The proposed stages of modeling of pyrolytic processes allows to speak about the development of the theoretical foundations of designing of pyrolysis processes of carbonaceous feedstock, which is carried out in the regime of oscillating temperature fields.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant no. 16-03-00123A) (2016–2018).

### References:

1. Bykov V.I., Lomakin S.M., Tsybenova S.B., Varfolomeev S.D. Kinetics of pulse pyrolysis of carbonaceous feedstock under oscillating temperature conditions // *Doklady Chemistry*. – 2015. – Vol. 462, pt. 4. – P. 112–114.
2. Bykov V.I., Lomakin S.M., Tsybenova S.B., Varfolomeev S.D. On the role of branched-chain (autocatalytic) reactions in the carbonaceous feedstock pyrolysis kinetics at oscillating temperature // *Doklady Chemistry*. – 2016. – Vol. 471, pt. 2. – P. 362–364.
3. Bykov V.I., Lomakin S.M., Tsybenova S.B., Varfolomeev S.D. Macrokinetic model of pyrolysis of carbonaceous feedstock in a tubular reactor // *Doklady Chemistry*. – 2016. – Vol. 467, pt. 1. – P. 76–78.
4. Bykov V.I., Lomakin S.M., Tsybenova S.B., Varfolomeev S.D. Optimal temperature conditions of carbonaceous feedstock pyrolysis // *Doklady Chemistry*. – 2016. – Vol. 470, pt. 2. – P. 302–306.
5. Bykov V.I., Lomakin S.M., Tsybenova S.B., Varfolomeev S.D. Modeling of carbonaceous feedstock pyrolysis in a multichannel reactor // *Doklady Chemistry*. – 2016. – Vol. 470, pt. 2. – P. 293–296.
6. Bykov V.I., Lomakin S.M., Tsybenova S.B., Varfolomeev S.D. Modeling of carbonaceous feedstock pyrolysis in a countercurrent tubular reactor // *Doklady Chemistry*. – 2017. – Vol. 475, pt. 2. – P. 192–195.
7. Bykov V.I., Lomakin S.M., Tsybenova S.B., Varfolomeev S.D. Macrokinetics of carbonaceous feedstock pyrolysis in a tubular reactor of variable cross section // *Doklady Chemistry*. – 2017. – Vol. 477, pt. 1. – P. 254–256.

УДК 602

## ФОРМИРОВАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОАНОДОВ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ БИОКАТАЛИЗАТОРОМ В МЕДИАТОРНЫХ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ

С. В. Алфёров А. П. Калейник В. О. Паславская

Тульский государственный университет, г. Тула, Россия, Пр-т Ленина, д. 92  
 e-mail: s.v.alfеров@gmail.com

Также, как и топливный элемент биологический топливный элемент (БТЭ) преобразует химическую энергию в электричество, однако в этом случае происходит окисление органических соединений с участием биокатализатора. Теоретически эффективность подобных устройств может быть довольно высокой, и кроме того в биотопливных элементах в качестве топлива могут использоваться сточные воды и отходы биотехнологических производств, что позволяет применять подобные устройства для комплексной защиты окружающей среды и водных экосистем.

**Ключевые слова:** биотопливный элемент, биокатализатор, иммобилизация, биоанод

В зависимости от типа применяемого биокатализатора БТЭ делятся на два типа: ферментные топливные элементы (ФТЭ) – обладают наибольшей эффективностью преобразования энергии; и микробные топливные элементы (МТЭ) – способны окислять широкий круг различных веществ.

Ранее было показано, что эффективным биокатализатором для БТЭ являются уксуснокислые бактерии *Glucopobacter oxydans*. Мембранная локализация ключевых ферментов клеточного метаболизма – де-гидрогеназ, позволяет использовать в качестве биокатализатора не только целые бактериальные клетки, но и мембранные фракции данных бактерий. Иммобилизация биокатализатора на поверхности анода способствует более быстрому и эффективному переносу электронов на электрод, а также позволяет многократно использовать применяемый биокатализатор.

Целью данной работы являлась разработка биоанодов содержащих иммобилизованные целые клетки и мембранные фракции бактерий *Glucopobacter oxydans*, для использования в макете медиаторного БТЭ.

Основу разрабатываемых биоанодов составляли 2 типа биокатализатора: целые клетки бактерий *G. oxydans* и ферментные препараты их мембранной фракции. Получение мембранной фракции проводилось путем разрушения клеток ультразвуковым диспергатором с последующим ступенчатым центрифугированием для осаждения крупного клеточного дебриса и непосредственно самих мембранных компонентов.

Для закрепления бактерий *G. oxydans* на поверхности электрода использовали метод включения целых клеток в пленку химически модифицированного поливинилового спирта. Иммобилизацию мембранной фракции проводили с использованием глутарового альдегида, который способен взаимодействовать с аминоклуппами белков, образуя матрицу на электроде.

Величины генерированного потенциала для БТЭ на основе иммобилизованных целых бактериальных клеток составляли –  $250 \pm 10$  мВ, для иммобилизованной мембранной фракции бактерий *G. oxydans*  $300 \pm 10$  мВ. Операционная стабильность отражает устойчивость величины генерируемого потенциала при добавлении одной и той же концентрации субстрата при проведении большого числа последовательных измерений и является одной из важнейших характеристик работы электрода. Количество последовательных измерений для иммобилизованных целых клеток бактерий *G. oxydans* составляет 8 раз, а для иммобилизованной мембранной фракции не менее 10.

Долговременная стабильность характеризует устойчивость работы электрода в течение длительного периода времени. За время стабильной работы иммобилизованного электрода принимается время, в течение которого величина генерируемого потенциала составляла не менее 50 % от первоначальной активности. Установлено, что долговременная стабильность для целых клеток бактерий составляет 7 суток, а при использовании мембранной фракции бактерии 5 суток.

Таким образом, применение биоанода на основе иммобилизованной мембранной фракции бактерий *G. oxydans* позволяет проводить не менее 10 последовательных измерений генерируемого потенциала, а значение его величины выше, чем для БТЭ на основе других биокатализаторов.

UDC 602

## DEVELOPMENT AND APPLICATION OF BIOANODES WITH IMMOBILIZED BIOCATALYST FOR MEDIATED BIOFUEL CELLS

S.V. Alferov, A.P. Kaleynik, V.O. Paslavskaya

Tula State University, Tula, Russia, Pr-t Lenina 92,  
e-mail: s.v.alferov@gmail.com

Just like a fuel cell, a biological fuel cell (BFC) converts chemical energy into electricity, but in this case, oxidation of organic compounds occurs with the participation of the biocatalyst. Theoretically, the efficiency of such devices can be quite high, and in addition biofuel cells could utilize waste water and waste from biotechnology production, which allows the use of such devices for integrated protection of the environment and aquatic ecosystems.

**Key words:** biofuel cell, biocatalyst, immobilization, bioanode

Depending on the type of biocatalyst in use, BFC are divided into two types: enzymatic fuel cells (EFC) – have the greatest energy conversion efficiency; and microbial fuel cells (MFC) – are able to oxidize a wide range of different substances.

It was shown that acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* are an effective biocatalyst for BFC. Membrane localization of key enzymes of cellular metabolism - dehydrogenases, allows to use as a biocatalyst not only whole bacterial cells, but also membrane fractions of these bacteria. Immobilization of the biocatalyst at the surface of the anode facilitates a faster and more efficient transfer of electrons to the electrode, and also allows the biocatalyst to be reused.

The aim of this work was the development of bioanodes containing immobilized whole cells and membrane fractions of bacteria *Gluconobacter oxydans*, for use in the mediator BFC.

For the development of bioanodes 2 types of biocatalyst have been used: whole cells of *G. oxydans* bacteria and enzyme preparations of their membrane fraction. The membrane fraction was obtained by breaking the cells with an ultrasonic disperser followed by stepwise centrifugation to precipitate large cell debris and the membrane components themselves. To fix the bacterial cell on the surface of the electrode, the incorporation of whole cells into a film of chemically modified polyvinyl alcohol was used. Immobilization of the membrane fraction was carried out using glutaraldehyde, which is capable of interacting with amino groups of proteins, forming a matrix on the electrode.

The values of the generated potential for BFC based on immobilized whole bacterial cells were  $250 \pm 10$  mV, and for the immobilized membrane fraction of *G. oxydans* were  $300 \pm 10$  mV. The operational stability reflects the stability of the generated potential value when one and the same substrate concentration is added carrying out a large number of measurements and it is one of the most important characteristics of electrode. The number of consecutive measurements for electrode with immobilized whole cells of *G. oxydans* bacteria was 8 times, and for immobilized membrane fraction no less than 10.

Long-term stability characterizes the stability of the electrode for a long period of time, when the value of the generated potential was at least 50% of the initial activity. It was established that the long-term stability for whole bacterial cells electrode was 7 days, and with the use of a bacterial membrane fraction was 5 days.

Thus, the use of a bioanode based on the immobilized membrane fraction of *G. oxydans* bacteria allows at least 10 consecutive measurements of the generated potential, and its value is higher than for BTE based on other biocatalysts.

УДК: 664.162.036.4:577.15, ББК: 35.71

## ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ХИМИКО-ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОЙ БИОМАССЫ В БАКТЕРИАЛЬНУЮ ЦЕЛЛЮЛОЗУ

Е.И.Кашеева

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), Россия, 659322, Бийск, Социалистическая, 1, massl@mail.ru, 89236499767

Представлены результаты исследования эффективности ферментативной трансформации от способа предварительной химической обработки лигноцеллюлозного сырья при получении питательных сред для синтеза бактериальной целлюлозы.



**Ключевые слова:** лигноцеллюлозное сырье, предварительная обработка, ферментативная трансформация, бактериальная целлюлоза.

Бактериальная целлюлоза является многофункциональным, востребованным в различных отраслях экономики соединением, а разработка технологии её получения из дешёвой лигноцеллюлозной биомассы – ультрасовременным трендом, позволяющим значительно снизить себестоимость [1-3]. При этом поиск эффективных способов предварительной обработки сырья и последующей его трансформации в растворы сахаров являются ключевыми проблемами.

В работе произведена оценка эффективности различных способов предварительной обработки при ферментативной трансформации лигноцеллюлозного сырья на модели мискантуса и плодовых оболочек овса. Рассмотрены следующие способы предварительной обработки: гидротермобарическая обработка (давление 1,5 МПа, продолжительность 600 с); обработка разбавленными растворами (концентрация 3-6 %, температура 90-95 °С) азотной кислоты или гидроксида натрия в одну стадию, последовательная двухстадийная обработка разбавленными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия в прямом и обратном порядке. Ферментативный гидролиз полученных субстратов проведен согласно авторской методике [4]. Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

В результате установлено, что максимальное увеличение реакционной способности к ферментативной трансформации происходит при обработке сырья разбавленными растворами азотной кислоты или гидроксида натрия в одну и две стадии. Одностадийные способы предварительной обработки являются более предпочтительными ввиду сокращения продолжительности обработки, экономии реактивов и энергии.

Таким образом, для получения питательных сред путем ферментативного гидролиза лигноцеллюлозного сырья, рекомендуется в качестве способа предварительной обработки сырья применять одностадийную обработку разбавленным раствором азотной кислоты или щелочи. При этом выход редуцирующих веществ от массы субстрата увеличивается в 6.6-7.3 раз по сравнению с сырьём: от 11.1 % до 79.9-80.5 % в случае мискантуса и от 12.2 % до 79.7-83.4 % в случае плодовых оболочек овса. Полученные гидролизаты являются преимущественно глюкозными, поскольку вклад пентоз в общую концентрацию редуцирующих веществ составляет 3.4-6.8 %, что важно для биосинтеза бактериальной целлюлозы.

#### 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. Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose // *Bioresource Technology*. – 2011. – 102. – P. 7354-7360.
3. Sakovich G.V., Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Aleshina L.A. Technological Fundamentals of Bacterial Nanocellulose Production from Zero Prime-Cost Feedstock // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – Vol. 477. – P. 357-359.
4. Denisova M.N., Makarova E.I., Pavlov I.N., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Enzymatic hydrolysis of hydrotropic pulps at different substrate loadings // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2016. – V. 178, № 6. – P. 1196-1206.

**Финансирование:** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

UDC 664.162.036.4:577.15, BBC 35.71

## FUNDAMENTALS OF CHEMICAL ENZYMATIC TRANSFORMATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS INTO BACTERIAL CELLULOSE

**E.Kashcheyeva**

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (IPCET SB RAS), Russia, 659322, Biysk, Socialisticheskaya, 1*

The study results are reported on the efficiency of enzymatic transformation depending on a pretreatment method of lignocellulosic feedstocks in preparing nutrient broths for the synthesis of bacterial cellulose.

**Key words:** lignocellulosic feedstock, pretreatment, enzymatic transformation, bacterial cellulose.

Bacterial cellulose is a multi-functional polymer demanded in different economic sectors, and the development

of the technology for producing the same from cheap lignocellulosic biomass is an ultramodern trend that enables cutting down on its prime cost [1-3]. With that, the quest for effective pretreatments of feedstocks and their transformation into sugar solutions are the key problems.

Here we evaluate the performance of different pretreatment methods in the enzymatic transformation of lignocellulosic biomass using *Miscanthus* and oat hulls. The following pretreatment methods are considered herein: steam explosion (1.5 MPa pressure, 600 sec time), one-stage treatment with dilute solutions (3-6% concentration, 90-95 °C) of nitric acid and or sodium hydroxide, sequential two-stage treatment with dilute solutions of nitric acid and sodium hydroxide in the direct and reverse order. The enzymatic hydrolysis of the resultant substrates was run by the proprietary procedure [4]. The research was conducted with equipment of the Biysk Regional Center of Collective Use of the SB RAS (IPCET SB RAS, Biysk).

The study revealed that the reactivity towards enzymatic transformation reaches the maximum when the feedstocks are treated with dilute solutions of nitric acid or sodium hydroxide in one and two stages. One-stage pretreatment techniques are of more choice owing to reduced treatment time, reagent and energy saving.

Thus, in order to obtain nutrient broths by enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, we advise to use the single-stage treatment with a dilute solution of nitric acid or sodium hydroxide, the yield of reducing sugars on substrate weight basis increasing by 6.6-7.3 times compared to the untreated feedstock: from 11.1 % to 79.9-80.5 % for *Miscanthus* and from 12.2 % to 79.7-83.4 % for oat hulls. The resultant hydrolyzates are mainly glucosic because the proportion of pentoses in total reducing sugars is 3.4-6.8 %, which is requisite for the biosynthesis of bacterial cellulose.

#### 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. Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L.S., Freire C.S.R., Silvestre A.J.D., Neto C.P. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose // *Bioresource Technology*. – 2011. – 102. – P. 7354-7360.
3. Sakovich G.V., Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Aleshina L.A. Technological Fundamentals of Bacterial Nanocellulose Production from Zero Prime-Cost Feedstock // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – Vol. 477. – P. 357-359.
4. Denisova M.N., Makarova E.I., Pavlov I.N., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Enzymatic hydrolysis of hydrotropic pulps at different substrate loadings // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2016. – V. 178, № 6. – P. 1196-1206.

**Grant:** The research was supported by a Russian Science Foundation grant (Project # 17-19-01054).

УДК 57.084.2

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ГИДРОЗОЛЯ АКТИВИРОВАННОГО ТОРФА ПРИ ВОЗДЕЛЫВАНИИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Косолапова Н.И., Проценко А.А., Мирошниченко О.В., Проценко Е.П.

1 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный университет»,  
2 ООО ТПК «КАВИТА»  
г. Курск, Россия  
30500, ул. Радищева, д. 33  
E-mail: Nataliko7@yandex.ru

Показана высокая эффективность применения нового биопрепарата при возделывании культуры озимой пшеницы в условия Ростовской области.

**Ключевые слова:** гуминовые биопрепараты, озимая пшеница

Увеличение урожайности озимой пшеницы при повышении качества ее зерна является актуальной задачей сельхозпроизводителей. Оптимальным решением такой задачи в условиях повышения требований к безопасности продукции и технологий ее получения может стать внедрение в практику возделывания культуры биопрепаратов. ООО ТПК «КАВИТА» производит биопрепарат «CAVITA BIOCMPLEX», представляющий из себя гидрозоль торфа, активированного ультразвуковой кавитационной обработкой при высоком статическом давлении без применения химических реагентов [патент]. В качестве основных биологически активных компонентов препарата выступают гумусовые кислоты, способные стимулировать рост и развитие растений. Были проведены

производственные испытания эффективности внекорневого применения указанного агропрепарата при возделывании озимой пшеницы сорта «Золушка» в условиях Орловского района Ростовской области – крупнейшего озимосеяющего региона РФ. Для испытаний были выделены контрольный участок (№1) площадью 10,4 га и два опытных участка (№2 и №3) площадью 15,3 га каждый, на которых, в соответствии с технологической картой, принятой в хозяйстве, возделывалась озимая пшеница. Исследуемый биопрепарат использовался для внекорневой обработки посевов в фазу выхода в трубку, совместно с гербицидами, макро- и микроэлементными удобрениями. На опытных участках №2 и №3 для обработки посевов применялись 0,5 и 1%-ные рабочие растворы препарата, на контрольном участке №1 в баковую смесь для внекорневой обработки исследуемый биопрепарат не вводился. Результаты испытаний представлены в таблице 1.

Таблица 1  
 Результаты оценки урожайности озимой пшеницы сорта «Золушка»

Варианты	S, га	Сырой вес биомассы пшеницы с 1-го кв.м, кг	Прибавка сырой биомассы к контролю, %	Итоговая урожайность, ц/га	Прибавка урожая к контролю, ц/га	Прибавка урожая к контролю, %
Участок №1	10,4	3,27	-	48,4	-	-
Опытный участок №2	15,3	3,79	15,9	59,5	11,1	15,9
Опытный участок №3	15,3	4,38	33,9	65,4	17,0	35,1
НСР05		0,3		6,8		

Внекорневая обработка посевов озимой пшеницы 0,5 и 1%-и рабочими растворами исследуемого биопрепарата привела как к значимому увеличению сырой биомассы посевов пшеницы в фазе налива и молочной спелости зерна на 15,9 % и 33,9%, так и к значимому увеличению итоговой урожайности культуры на 15,9% и 35,1%, соответственно. Кроме того, внекорневая обработка привела к повышению качества собранного зерна. Так, с опытных вариантов было собрано зерно, характеризующееся повышенной натурностью, при этом максимального значения этот показатель достигает для зерна, собранного с делянки, обработанной 0,5%-ным раствором препарата (893 г/л против 795 г/л на контроле), что свидетельствует о потенциальной возможности получения большего количества муки из данного зерна. Также повышено качество белка на 7 и 9% относительно контроля и клейковины на 7 и 8% при незначительном снижении ее количества для участков №1 и №2 соответственно. Следует отметить, что благоприятные климатические условия формирования и созревания зерна озимой пшеницы, сложившиеся в 2016-2017 сельскохозяйственном году в районе проведения испытаний, способствовали полной реализации прибавок надземной биомассы, возникших на вариантах опыта с внекорневой обработкой биопрепаратом в итоговую высокую урожайность.

*Литература:*

1. Патент 2533235 Российская Федерация. Способ получения биогеля и биогель. О.В. Володина, А.В. Смородько. Заявл. 03.07.2013; опубл. 07.08.2014.UDC 57.084.2

UDC 57.084.2

## THE EFFECTIVENESS OF THE BIOPREPARATION'S APPLIANCE IN TERMS OF HYDROSOLE OF ACTIVATED PEAT DUE TO CULTIVATING OF WINTER WHEAT

**Kosolapova N.I., Protsenko A.A, Miroshnichenko O.V., Protsenko E.P.**

*Kursk State University  
 Russia, 305000, Kursk, Radishcheva st., 33  
 E-mail: Nataliko7@yandex.ru*

There has been shown the effectiveness of the new biopreparation's appliance due to cultivating the crop of winter wheat in the conditions of Rostov region.

**Key words:** humic biopreparations, winter wheat

Increasing the yield of winter wheat in terms of increasing of its grain quality is the relevant objective of the

agricultural producers. The optimal solution of this objective in the conditions of stepping up the requirements to the safety of goods and the technologies of its obtainment can be the reduction to practice of cultivating the crop of the biopreparations. Limited liability company Trade and Manufacturing Company «CAVITA» produces the biopreparation «CAVITA BIOCOMPLEX», which is the hydrosol of activated peat by ultrasonic cavitation processing at high static pressure without the use of chemical reagents [patent]. Humus acids are the main biologically active components of the preparation. Humus acids stimulate the growth and the development of plants. There has been organized the production testing of the effectiveness of the foliar appliance of this agro product due to cultivating of winter wheat, the cultivar of which is “Золушка” (“Zoluska”) in the conditions of Orlovsky district of Rostov region. It is the largest winter-sowing region in the Russian Federation. For testing there have been used the control plot (No 1), the square of which is 10.4 ha and two experimental plots (No 2 and No 3), the square of which plot is 15.3 ha. In accordance with maintenance requirement card used in husbandry there has been cultivated winter wheat on these plots. The biopreparation under investigation has been used for foliar processing of sowing in phase of stem elongation combined with herbicides, macro- and microelement fertilizers. On the experimental plots No 2 and No 3 to process sowing there have been used one-half percent working solution and one-percent working solution of the preparation. On the control plot No 1 the biopreparation under investigation has not been injected into tank mixture for foliar processing. The results of the investigation are shown in Table 1.

Table 1

The results of the value of yield of winter wheat of the cultivar “Zoluska” (“Золушка”)

Variants	S, ha	The fresh weight of biomass of wheat from 1 square metre, kg	Adding the fresh biomass to the control, %	Total yield, dt/ ha	Adding yield to the control, dt/ha	Adding yield to the control, %
Plot No 1	10.4	3,27	-	48.4	-	-
Experimental plot No 2	15.3	3,79	15.9	59.5	11.1	15.9
Experimental plot No 3	15.3	4,38	33.9	65.4	17.0	35.1
HCP05		0,3		6.8		

Foliar processing of sowing of winter wheat by one-half percent working solution and one-percent working solution of the biopreparation under investigation has led to a significant increase of the fresh biomass of wheat sowing in the phase of plumpness and kernel milk line by 15.9% and 33.9% consequently. It has also led to an increase of total yield of the crop by 15.9% and 35.1% consequently. Besides, foliar processing has increased the quality of the harvested grain. Thus, from the experimental variants there has been harvested grain, which is characterized by higher naturalness, moreover, this indicator reaches maximum for grain, harvested from the plot, processed by one-half percent solution of the preparation (893 g/l against 795 g/l at the control). It proves that there is a potential opportunity to get a great amount of flour from this grain. There has also been increased the quality of the proteic substance by 7% and 9% towards the control and fibrin has been increased by 7% and 8% in the terms of a slight decline of its quantity for Plot No 1 and Plot No 2 consequently. It should be remarked that climatic conditions favorable for the formation and the maturation of the grain of winter wheat, which had place in the period of grain year of 2016-2017 in the region of carrying out of tests have led to full implementation of adding of above ground biomass, appeared in the testing variants with foliar processing by the biopreparation into total high yield.

References:

1. Patent 2533235 the Russian Federation, “The way of getting biogel. Biogel.” / Volodina O.V., Smorodko A.V., register 03.07.2013, publ. on August 7, 2014

УДК 663.5

## ЭФФЕКТИВНЫЙ КОНТРОЛЬ BIOTECHNOLOGического ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА СПИРТА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ВЭЖХ

Павленко С.В., Абрамова И.М, Поляков В.А., Медриш М.Э.

Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия  
 111033, г. Москва, ул. Самокатная, дом 4б.  
 e-mail: technohimkontrol@mail.ru

Разработана методика одновременного определения углеводов и органических кислот в полупродуктах спиртового производства с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с рефрактометрическим детектированием.

**Ключевые слова:** углеводы, органические кислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография, рефрактометрический детектор.

Современные технологии производства спирта из зернового сырья направлены на получение высококачественного конечного продукта [1].

При сбраживании зернового суслу изменяется обмен веществ спиртовых дрожжей, что приводит к необходимости контроля процессов их метаболизма [2]. Проведение мониторинга технологического процесса производства спирта с использованием инструментальных методов анализа позволяет своевременно выявлять нарушения и не допускать выпуска низкокачественного продукта.

Органические кислоты играют важную роль в метаболизме углерода, энергетическом обмене микроорганизмов, синтетических и диссимиляционных процессах. Среди органических кислот в зерновом сусле и бражке преобладают уксусная, яблочная, молочная, янтарная, излишнее количество которых оказывает ингибирующее действие на дрожжи [3].

Углеводы являются источником углерода для дрожжей. В первую очередь дрожжами потребляются глюкоза и фруктоза, при их отсутствии – мальтоза.

Поэтому одновременное количественное определение содержания органических кислот и углеводов является важнейшей и актуальной задачей в контроле спиртового производства [4].

Была разработана новая методика одновременного определения углеводов и органических кислот в полупродуктах спиртового производства с применением одного из наиболее востребованных инструментальных методов анализа - высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием рефрактометрического детектирования, позволяющим проводить высокочувствительный и точный анализ.

Установлен диапазон измерений массовых концентраций углеводов и органических кислот 0,001- 4,0 г/100 см<sup>3</sup>, градуировочные зависимости линейны с коэффициентом корреляции > 0,999 в диапазоне 0,1-1,0 г/100 см<sup>3</sup>. Нижний предел количественного определения составляет 0,001 г/100 см<sup>3</sup>.

Допускается применять метод для определения более высоких концентраций углеводов и органических кислот после разбавления проб деионизованной водой.

С применением разработанной методики были исследованы образцы суслу и бражки из различного зернового сырья. Полученные результаты позволяют оценить эффективность процесса спиртового производства.

Данная методика может применяться для мониторинга динамики изменения углеводного состава и органических кислот в процессе технологического процесса брожения, тем самым повышая эффективность контроля биотехнологического процесса производства спирта.

### Литература:

1. Абрамова И.М. Научное обоснование методологии комплексного контроля спиртового и ликероводочного производства с целью повышения качества и безопасности алкогольной продукции: Автореф. дис. докт. техн. наук. - Москва, 2014. – 51 с.
2. Римарева, Л.В. Влияние ферментативных систем на биохимический состав зернового суслу и культуральные свойства осмофильной расы спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2013. - №1. – С. 18-19.
3. Сербя, Е.М. Исследование метаболитов, сопутствующих синтезу этанола при сбраживании концентрированного зернового суслу осмофильным штаммом дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2013. - №2. – С. 16-19.

4. Маринченко В.А. Технология спирта. В.А. Маринченко, В.А. Смирнов, Б.А. Устинников. – М.: Легкая и пищевая пр-ть, 1981. – 416 с.

UDC 663.5

## EFFECTIVE CONTROL OF BIOTECHNOLOGICAL PROCESS OF ALCOHOL PRODUCTION USING HPLC METHOD

**Pavlenko S.V., Abramova I.M., Polyakov V.A., Medrish M.E.**

All-Russian Research Institute of Food Biotechnology - a branch of the Federal State budget institution of science of «Federal research centre of food, biotechnology and food safety», Moscow, Russia  
111033, Moscow, Samokatnaya str., 4b.  
e-mail: [technohimkontrol@mail.ru](mailto:technohimkontrol@mail.ru)

It has been developed a method for the simultaneous determination of carbohydrates and organic acids in semi-products of alcohol production using the method of high-performance liquid chromatography with refractometric detection.

**Key words:** carbohydrates, organic acids, high-performance liquid chromatography, refractometric detector.

Modern technologies of alcohol production from grain raw materials are aimed at obtaining a high-quality final product [1].

During the fermentation the grain wort is changed metabolism of alcohol yeast, which leads to the need to control the processes of their metabolism [2]. Conducting monitoring of the technological process of alcohol production using instrumental methods of analysis allows timely detection of violations and prevents the release of a low-quality product.

Organic acids play an important role in the metabolism of carbon, energy metabolism of microorganisms, synthetic and dissimilative processes. Among the organic acids in grain wort and mash are predominate acetic acid, malic acid, lactic acid, succinic acid, the excessive amount of which has an inhibitory effect on the yeast [3].

Carbohydrates are the source of carbon for yeast. First of all yeast will consume glucose and fructose, in their absence - maltose.

Therefore, simultaneous quantitative determination of the content of organic acids and carbohydrates is the most important and urgent task in controlling alcohol production process [4].

It has been developed a new method for simultaneous determination of carbohydrates and organic acids in semi-products of alcohol production using one of the most popular instrumental method of analysis - high-performance liquid chromatography with refractometric detection, which allows highly sensitive and accurate analysis.

A range of measurements of mass concentrations of carbohydrates and organic acids - 0,001 - 4,0 g/100 sm<sup>3</sup>, the calibration curves are linear with the correlation coefficient 0.999 in the range 0.1 - 1.0 g/100 cm<sup>3</sup>. The lower limit of quantification is 0.001 g /100 cm<sup>3</sup>.

New method can be used to determine higher concentrations of carbohydrates and organic acids after dilution with de-ionized water.

Using the developed technique, samples of wort and mash from various grain raw materials were investigated. The received results allow estimating efficiency of alcohol production process.

This method can be used to monitor the dynamics of changes in the carbohydrates and organic acids composition during the process of fermentation, thereby increasing the efficiency of controlling the biotechnological process of alcohol production.

### References:

1. Abramova I.M. Scientific substantiation of the methodology of integrated control over alcohol and distillery production with the purpose of improving the quality and safety of alcohol products: Abstract. dis. Doct. tech. sciences. - Moscow, 2014. - 51 p.
2. Rimareva, L.V. Influence of enzymatic systems on the biochemical composition of grain wort and the cultural properties of the osmophilic race of alcoholic yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Production of alcohol and alcoholic beverages. - 2013. - №1. - P. 18-19.
3. Serba, E.M. Investigation of metabolites accompanying the synthesis of ethanol during fermentation of concentrated grain wort by the osmophilous strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Production of alcohol and alcoholic beverages. - 2013. - №2. - P. 16-19.
4. Marinchenko V.A. Technology of alcohol. V.A. Marinchenko, V.A. Smirnov, B.A. Ustinniki. - M.: Light and food pr-t, 1981. - 416 p.

## ЭКСПРЕССИЯ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА В ТРАВЯНИСТЫХ РАСТЕНИЯХ (FESTUCA PRATENSIS H.), ПОДВЕРГШИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ

А. Мурташ <sup>1</sup>, М. Яскулак <sup>1</sup>, А. Рорат <sup>2</sup>, З. Шаабене <sup>2</sup>, А. Гробелак <sup>2</sup>, М. Каспрчак <sup>1</sup>, Ф. Ванденбулке <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Технологический университет г. Ченстохова, факультет инфраструктуры и окружающей среды, кафедра экологического инжиниринга. Польша, 42-256, г. Ченстохова, ул. Дабровского, 69, [murtasaneta@gmail.com](mailto:murtasaneta@gmail.com), +48531623008

<sup>2</sup> Университет г. Лилль, лаборатория окружающей среды и гражданского строительства, группа экотоксикологии, F-59650 Villeneuve d'Ascq, Франция, [murtasaneta@gmail.com](mailto:murtasaneta@gmail.com), +48531623008

Вредное воздействие тяжёлых металлов (ТМ) на живые составляющие экосистемы, включая растения, к настоящему времени хорошо документировано. Фиторемедиация является наиболее распространённым способом очистки почв. Высокая эффективность фиторемедиации достигается путём точного планирования процесса с использованием правильного и тщательного подбора видов используемых растений. Такой подбор осуществляется по большому количеству имеющихся маркеров, позволяющих контролировать воздействие ТМ на растения, однако по некоторым из них отсутствуют точные данные. Подбор подходящего маркера требует понимания механизмов токсического воздействия ТМ. Установлено, что во многих случаях токсичность ТМ тесно коррелирует с возникновением окислительного стресса в клетках и выработкой белков, связывающих металлы (например, металлотионеинов или фитохелатинов). Поскольку выработка металлотионеинов коррелирует с содержанием металла в клетке, уровень экспрессии гена, кодирующего этот белок, может дать информацию о текущем уровне стресса, испытываемого клеткой. Главная цель нашего исследования состояла в определении возможности использования уровня экспрессии МТ в качестве маркера, позволяющего дать оценку окислительного стресса в клетках растений, с тем чтобы использовать такую оценку для контроля и планирования процесса фиторемедиации. В ходе нашего эксперимента мы изучали воздействие тяжёлых металлов (Pb, Cd, Ni и Zn) в двух различных концентрациях (360 мг/кг и 720 мг/кг почвы в пересчёте на сухой вес) на уровень экспрессии МТ в травянистом растении *Festuca pratensis* H (разновидность овсяницы). В рамках нашего исследования проводился опыт в вегетационных сосудах с использованием затравок, специфических для испытываемых видов растений, и выполнялась количественная ПЦР в реальном времени. Полученные данные показывают значительное воздействие ТМ на экспрессию МТ. У растений, выращенных на почве с более высокой концентрацией тяжёлых металлов (за исключением Zn), относительный уровень экспрессии МТ был более низким по сравнению с почвой с менее высокой концентрацией. Более того, нами были выявлены различия в уровнях экспрессии МТ между растениями, выращенными на почвах, загрязнённых разными металлами. Таким образом, уровень экспрессии МТ может использоваться как эффективный и чувствительный маркер окислительного стресса, особенно при планировании фиторемедиации и контроле за её ходом.

**Ключевые слова:** биоремедиация, тяжёлые металлы, окислительный стресс, металлотионеины, овсяница (*Festuca*), маркеры окислительного стресса

В современных условиях загрязнение почв тяжёлыми металлами представляет собой серьёзную и трудноразрешимую проблему, являющуюся предметом внимания учёных и экологов. Растущее содержание примесей тяжёлых металлов в почвах во многих случаях исключает возможность использования таких почв в сельском хозяйстве. При этом концентрация примесей тяжёлых металлов во многих регионах не только не снижается, но и растёт вызывающими тревогу темпами из-за безответственного управления многими производственными отраслями, что приводит к нарушению обмена веществ растений и угнетению их роста. Более того, продолжающееся развитие промышленности, сопровождающееся отводом земель под предприятия, уменьшает долю земной поверхности, доступную для ведения сельского хозяйства (A.J.M. Baker et al., 1994). Поскольку тяжёлые металлы представляют собой потенциальную угрозу биоценозу, экологи и учёные делают всё возможное для очистки почв (Mahar et al., 2016). Вместе с тем необходимо отметить, что существуют виды растений, приобретшие в результате эволюции специфические системы защиты в ответ на высокое содержание ТМ в почве; более того, такие виды способны накапливать в своих клетках существенные количества примесных тяжёлых металлов и при этом развиваться нормально, в связи с чем такие виды растений широко

применяются в процессе фиторемедиации (M.A. Rahman., 2016). Высокая эффективность фиторемедиации достигается за счёт точного выполнения процесса планирования и контроля. Несмотря на большое число известных маркеров стресса, таких как показатель всхожести семян, многие маркеры либо недостаточно чувствительны, либо не отражают адаптивные свойства растений. Необходимые элементы управления процессом фиторемедиации не изучались, поскольку главная цель нашего исследования состояла в оценке уровня экспрессии МТ как маркера окислительного стресса, вызываемого примесями металлов.

Растительный материал и условия выращивания *Festuca pratensis* H. выращивалась в климатической камере в горшочках, содержащих 200 г торфяной почвы (Biogenet, Poland), в условиях контролируемых по световому периоду (16:8) и температуре (21 °С днём и 18 °С ночью). Растения выращивались в течение 28 дней на почве, загрязнённой смесью ТМ (взятой из района, расположенного рядом с цинковым заводом), а также на почве, в которую были внесены нитраты свинца (Pb), цинка (Zn), кадмия (Cd) и меди (Cu) в двух различных концентрациях (360 и 720 мг/кг сухого веса). В качестве контрольного образца использовалась трава, выращенная на торфяной почве без каких-либо добавок. Для каждого набора условий было приготовлено по три экземпляра каждого горшочка. После завершения опыта у образцов были измерены такие параметры, как длина корневой системы, генотоксичность (метод ДНК-комет) и экспрессия МТ. Метод ДНК-комет использовался по Olive et al., 2006.

Изоляция РНК и обратная транскрипция Гомогенизация замороженных побегов растений выполнялась с помощью механического гомогенизатора (IKA Labortechnik, USA). Выделение тотальной РНК из 100 г биомассы производилось с помощью универсального набора для очистки ДНК/РНК/белков (Universal DNA/RNA/Protein Purification Kit (EURx®, Poland)) в соответствии с протоколом изготовителя. Обратная транскрипция по 0,5 мг РНК проводилась с использованием набора NG dART RT Kit (EURx®, Poland). Изоляция РНК и дальнейший анализ выполнялся дважды для каждого образца.

Количественная ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) Количественная оценка уровня экспрессии генов выполнялась с использованием специфичных праймеров на актин (ACT), фактор элонгации 1-альфа (EF) как эталонные гены, и на металлотioneин (MT) как целевой ген. Праймеры были разработаны с помощью программного обеспечения Primer3Plus и добавлялись в конечной концентрации 300nM. Количественная ПЦР в реальном времени выполнялась с помощью системы Stratagene MX3005P qPCR System (Sigma, USA). Для подготовки использовался набор MESA Blue qPCR Master Mix Plus SYBR Assay No ROX (Eurogene, Belgium). Реакции к-ПЦР в ПВ выполнялись с использованием чашек twin.tec PCR plate (Eppendorf, Germany). Отдельные продукты по каждому гену показаны с помощью кривых ликвидуса.

Результаты представлены в виде среднего значения Cs при одной среднеквадратичной погрешности.

Метод ДНК-комет выявил значимые различия в целостности ДНК. Наибольшая деградация ДНК наблюдалась у растений, выращенных на почве, загрязнённой смесью тяжёлых металлов. Полученные данные показали статистически значимые различия в относительных уровнях экспрессии МТ по ANOVA с ретроспективным критерием Тьюки и значением  $p$  меньше 0,05. У образцов растений, выращенных на почве с более высокими концентрациями тяжёлых металлов, относительный уровень экспрессии МТ был ниже (за исключением Zn) по сравнению с образцами, выращенными на почвах с более низкими концентрациями ТМ. При этом нами было установлено, как и при использовании метода ДНК-комет, что самые высокие уровни относительной экспрессии МТ были у растений, выращенных на почвах, загрязнённых смесью металлов. Кроме того, были отмечены различия в относительных уровнях экспрессии МТ между растениями, выращенными на почвах, загрязнённых разными металлами.

1. *Festuca pratensis* H., подвергшаяся воздействию высокой концентрации тяжёлых металлов.

2. Воздействие тяжёлых металлов на уровень экспрессии металлотioneина и сравнение его чувствительности с чувствительностью других маркеров стресса (пероксидазы гваякола и общего содержания хлорофилла).

3. Определение возможности использования уровня экспрессии МТ как маркера для оценки окислительного стресса в растительных клетках.



## EXPRESSION OF METALLOTHIONEIN IN GRASS (FESTUCA PRATENSIS H.) EXPOSED TO HEAVY METALS

A.Murtaś<sup>1</sup>, M.Jaskulak<sup>1</sup>, A.Rorat<sup>2</sup>, Z.Chaabene<sup>2</sup>, A.Grobelak<sup>2</sup>, M.Kacprzak<sup>1</sup>, F.Vandenbulcke<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Czestochowa University of Technology, Faculty of Infrastructure and Environment, Department of Environmental Engineering, Poland, 42-256, Czestochowa, Dabrowskiego, 69, murtasaneta@gmail.com, +48531623008

<sup>2</sup> University of Lille, Environmental and Civil Engineering Laboratory, Ecotoxicology group, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France, murtasaneta@gmail.com, +48531623008

The harmful influence of heavy metals (HM) on a lively part of the ecosystem, including plants, have been well documented. In order to clean-up the contaminated soil, the most commonly used method is phytoremediation. To achieve a high efficiency of the phytoremediation it is necessary to precisely plan the process with a carefully and adequately selected plant species. To achieve high efficiency of phytoremediation, there are available many markers for controlling the impact of HM on plants, however, some of them do not provide precise data. Looking for a suitable marker, it is needed to understand HM toxicity mechanisms. It has been found, that toxicity of HM is often closely correlated with initiation of oxidative stress in cells and metal-binding protein production (like metallothionein or phytochelatins). Since, metallothionein is correlated to the metal content in the cell, the expression level of gene coding this protein may provide information about current stress that the cell is struggling. The main aim of our study was to determinate of the possibility of using the MT expression level as a marker for the evaluation an oxidative stress in plant cells that may be used in controlling and planning the phytoremediation process. In this experiment, we studied the influence of heavy metals (Pb, Cd, Ni and Zn in two different concentrations 360mg/kg dw of soil and 720 mg/kg dw of soil) on the MT expression level in a grass *Festuca pratensis* H. Our study included pot experiment, primers design that are specific for tested plant species and performing the real-time qPCR. Achieved data showed a significant impact of HM on the expression of MT. For plants grown on the soil with the higher concentration of heavy metals the relative expression level of MT was lower (except Zn) in comparison with lower concentration. Moreover, we have noticed differences in the MT expression level between plants grown on the soil with different metals treatment. Thus, the expression level of MT may be effectively used as a sensitive marker of oxidative stress, and it can be particularly useful in phytoremediation planning and proper control.

**Key words:** bioremediation, heavy metals, oxidative stress, metallothioneins, *Festuca*, oxidative stress markers

Soil contamination with heavy metals currently consist a serious and difficult issue of what scientists and ecologist are struggling with. Increasing concentration of metal trace elements in soil often excluded it from the possibility to use for an agricultural purposes. Nevertheless, the concentration of the metal trace elements in many areas does not decrease and even it increases at an alarming rate due to the irresponsible management of many branches of industry causing a metabolic disorders and a growth inhibition for plants. Moreover, the progressive development of industry connected with a land development makes that the surface of the land available for agriculture use is decreasing (A.J.M. Baker et al., 1994). Since heavy metals are a potential danger for biocoenosis, ecologist and scientist are making every effort to clean-up the soil (Mahar et al., 2016). However, it is worth noticing that there are some plant species which have evolved a specific defense systems in response to high HMs content in the soil, and moreover, those species are able to accumulate a substantial amounts of metal trace elements in their cells and develop properly, thus this species are widely used in the phytoremediation process (M.A. Rahman., 2016). In order to achieve the high efficiency of phytoremediation the precise process of planning and controlling is required. There are many available stress markers such as germination index, nevertheless, many of them are not sensitive enough, or don't include the adaptive properties of plants. Going against to necessity to control of phytoremediation, as the main aim of our study was to estimate MT expression level as a marker of oxidative stress induced by metal trace elements.

Plant material and treatment *Festuca pratensis* H. was grown in pots containing 200 g of peat soil in a climatic chamber (Biogenet, Poland) in controlled conditions with 16:8 period and temperature 21°C during the day and 18°C during the night. Plants were grown on the soil contaminated with a mixture of HMs (from the area in a neighborhood of zinc smelter), and on the soil spiked by nitrates of lead (Pb), zinc (Zn), cadmium (Cd) and copper (Cu) in two different concentrations (360 and 720 mg/kg dw) during 28 days. Control for the research constituted grass grown on peat soil with no additives. Each pot conditions were prepared in triplicates. Collected samples were tested for the root length, genotoxicity (Comet assay) and expression of MT. The Comet assay was performed with using a Olive et al. 2006 method.

Isolation of RNA and reverse transcription A homogenization of frozen plant shoots was performed by using a mechanical homogeniser (IKA Labor Technik, USA). Total RNA isolation from 100 g of biomass was performed with Universal DNA/RNA/Protein Purification Kit (EURx®, Poland) according to manufacturer's protocol. Reverse transcription for 0.5 µg RNA was conducted with using of NG dART RT Kit (EURx®, Poland). Isolation of RNA and further analysis for each sample was performed in duplicates.

RT-qPCR The quantification of the gene expression level was performed using specific primers for the ACT (actin), EF (elongation factor 1-α) as a reference genes and for MT (metallothionein) as a target gene. Primers were designed with using Primer3Plus software and added in final concentration 300 nM. A qPCR analysis was conducted with a Stratagene MX3005P qPCR System (Sigma, USA). For the preparation of qPCR we used a MESA Blue qPCR Master Mix Plus SYBR Assay No ROX (Eurogene, Belgium). The qPCR reactions were performed with using plates (twin.tec PCR plate, Eppendorf, Germany). Single products for each genes were shown by melting curves.

The results were shown as a Cs mean value with the standard error.

According to the Comet assay, the significant differences were noticed in the DNA integrity. The highest DNA degradation was found for plants grown on the soil contaminated with a mixture of heavy metals. Achieved data showed a statistically significant differences in the relative expression level of MT according to the ANOVA with post-hoc Tukey test with p value below 0.05. In samples of plants that grown on the soil with the higher concentration of heavy metals the relative expression level of MT was lower (except Zn) in comparison with the samples grown on the soil with lower HMs concentration. Nevertheless, as in the case of Comet assay, we noticed that the highest MT relative expression level was for plants grown on the soil with a mixture of metals. Moreover, we have noticed a differences in the MT relative expression level between plants grown on the soil contaminated with different metals.

1. *Festuca pratensis* H. exposed to the high concentration of heavy metals.
2. Impact of the heavy metals on the expression level of metallothionein and comparison its sensitivity with other stress markers such as guaiacol peroxidase and total chlorophyll content.
3. Determination of the possibility of using the MT expression level as a marker for the evaluation an oxidative stress in plant cells.

## ЭКСПРЕССИЯ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ И ДРУГИХ МАРКЕРОВ СТРЕССА У РАСТЕНИЙ, ПОДВЕРГАЮЩИХСЯ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ И НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

М. Яскулак <sup>1</sup>, А. Мурташ <sup>1</sup>, А. Рорат <sup>2</sup>, А. Гробелак <sup>1</sup>, З. Шаабене <sup>2</sup>, М. Каспрчак <sup>1</sup>, Ф. Ванденбулке <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Технологический университет г. Ченстохова, факультет инфраструктуры и окружающей среды, кафедра экологического инжиниринга. Польша, 42-256, г. Ченстохова, ул. Дабровского, 69, [martajaskulak@gmail.com](mailto:martajaskulak@gmail.com)

<sup>2</sup> Университет г. Лилль, лаборатория окружающей среды и гражданского строительства, группа экотоксикологии, F-59650 Villeneuve d'Ascq, Франция

В связи с обострением в последние годы проблемы загрязнения почв тяжёлыми металлами особое внимание уделяется усилиям по разработке новых высокочувствительных, но не требующих большого количества времени методов обнаружения стресса у растений, которые позволяли бы определять степень загрязнения и возможные способы фиторемедиации, а также могли бы использоваться для оценки эффективности фиторемедиации.

**Ключевые слова:** биоремедиация, тяжёлые металлы, окислительный стресс, металлотиионы, овсяница (*Festuca*), маркеры окислительного стресса

Новые знания о способности растений выдерживать воздействие ионов металлов, накапливать и нейтрализовать их необходимы для достижения следующих целей: (i) для усиления способности накапливать металлы, являющиеся пищевыми микроэлементами, (ii) для очистки загрязнённых почв, (iii) с целью добычи редкоземельных металлов, способных накапливаться в растениях, и (iv) с целью оценки рисков для человеческого здоровья, связанных с накоплением металлов в пищевых растительных культурах. Тяжёлые металлы попадают в почвы главным образом в результате действия антропогенных факторов и деятельности человека, например работы таких отраслей как горнодобывающая и обрабатывающая промышленность, а также сельское хозяйство. Бионакопление тяжёлых металлов в элементах пищевой цепочки после их поглощения растениями может увеличивать экотоксикологические риски, связанные с рекультивацией и восстановлением почв с использованием растений. Исследования

сверхэкспрессии у растений показали способность определённых белков – металлотионеинов (МТ) – осуществлять гипернакопление тяжёлых металлов, однако практически отсутствуют работы по сравнительному анализу накопления тяжёлых металлов различными типами МТ одного и того же вида растения. Главная цель нашего исследования заключалась в оценке чувствительности и возможных вариантов применения отдельных методов количественного анализа, в том числе экспрессии гена МТ в процессе фиторемедиации, для оценки уровня стресса у растений, произрастающих на загрязнённой почве. Цели исследования также включали в себя сравнение и оценку чувствительности отдельных маркеров стресса у растений, подвергшихся воздействию тяжёлых металлов и наночастиц серебра, в целях разработки анализа на токсичность. Такие методы количественного анализа могли бы стать полезным инструментом экологической инженерии, например, индикатором степени загрязнённости почвы и эффективности фиторемедиации. Кроме того, наше исследование выявило воздействие ТМ и наночастиц серебра на уровень экспрессии металлотионеинов, а также на активность гваякол-зависимой пероксидазы, общую концентрацию белка, повреждение ДНК и содержание хлорофилла. Исследование проводилось на горчице белой (*Sinapis alba* L.) как растении-модели, произрастающем как на почве, загрязнённой в результате промышленной деятельности в прошлом, так и на лабораторной почве, искусственно загрязнённой нитратами кадмия, свинца, никеля, цинка, а также наночастицами серебра.

## EXPRESSION OF METALLOTHIONEINS AND OTHER STRESS MARKERS IN PLANTS EXPOSED TO HEAVY METALS AND SILVER NANOPARTICLES

M. Jaskulak <sup>1</sup>, A. Murtas <sup>1</sup>, A. Rorat <sup>2</sup>, A. Grobelak <sup>1</sup>, Z. Chaabene <sup>2</sup>, M. Kacprzak <sup>1</sup>, F. Vandenbulcke <sup>2</sup>

*1 Czestochowa University of Technology, Faculty of Infrastructure and Environment, Department of Environmental Engineering, \*martajaskulak@gmail.com*

*2 University of Lille, Environmental and Civil Engineering Laboratory, Ecotoxicology group, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France;*

Due to a rising problem of soil pollution with heavy metals in recent years, special focus is put on further development of quick but highly sensitive, plant stress detection methods that will allow to determinate the severity of contamination and possible options of phytoremediation as well as an indicator of the efficiency of phytoremediation.

**Key words:** bioremediation, heavy metals, oxidative stress, metallothioneins, *Festuca*, oxidative stress markers

Further knowledge about plants ability to tolerate, accumulate and detoxicate metal ions is necessary for several purposes: (i) for enhancing accumulation of metals that are microelements for nutritional purposes, (ii) for cleaning up contaminated soils, (iii) to mine rare metals which can be accumulated in plants, (iv) to predict health risk induced by metal accumulation in crops. Heavy metals in soil are mostly caused by anthropogenic activities such as mining, manufacturing, and agriculture. Bio-accumulation of heavy metals in the food chain, following their uptake to plants can increase the ecotoxicological risks associated with remediation of contaminated soils using plants. Overexpression studies in plants have demonstrated the ability of specific proteins - metallothioneins (MTs) to hyperaccumulate heavy metals, but a comparative analysis of heavy metal accumulation by different types of MTs from the same species is largely unavailable. The main aim of the study was to evaluate sensitivity and potential applications of using the selected assays including the expression of MT gene in phytoremediation process to assess stress level in plants on contaminated soil. The aim of the study also included the comparison and evaluation of the sensitivity of selected stress markers in plants exposed to heavy metals and silver nanoparticles in order to develop a toxicity test. Such assay may be a useful tool in the environmental engineering, for example as an indicator of the severity of soil pollution in phytoremediation efficiency. Moreover, the study demonstrated the influence of HMs and silver nanoparticles on the expression level of metallothioneins as well as on the activity of guaiacol peroxidase, total protein concentration, DNA damage and the content of chlorophyll. Study was performed on *Sinapis alba* L. as a model plant on soil contaminated by past industrial activities and on soil contaminated artificially in lab by cadmium, lead, nickel, zinc and silver nanoparticles.

## ЛЕСНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ. ОТ НАУКИ К ПРАКТИКЕ

## FOREST BIOTECHNOLOGY. FROM SCIENCE TO PRACTICE

1. АДАПТИВНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЕЛИ, Политов Д.В., Белоконь М.М., Белоконь Ю.С., Мудрик Е.А., Полякова Т.А., Салливан А., Крутовский К.В. ....	762
ADAPTIVE GENETIC STRUCTURE IN SPRUCE POPULATIONS, Politov D.V., Belokon M.M., Mudrik E.A., Polyakova T.A., Sullivan A., Krutovsky K.V. ....	763
2. CORTEX LEVIS VERRUCOSA – ПЕРСПЕКТИВНАЯ ФОРМА ЕЛИ ДЛЯ ЛЕСНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ, Иванчина Л.А., Залесов С.В., Кожевников А.П. ....	764
CORTEX LEVIS VERRUCOSA IS A PERSPECTIVE SPRUCE FORM FOR FOREST BIOTECHNOLOGY, Ivanchina L.A., Zalesov S.V., Kozhevnikov A.P. ....	765
3. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ЛИСТВЕННЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД, Лебедев В. Г., Шестибратов К.А. ....	766
BIOTECHNOLOGY METHODS FOR DECIDUOUS FOREST TREE BREEDING, Lebedev V. G., Shestibratov K.A. ....	766
4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИРОДНЫХ И ИСКУССТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ, Калько Г.В., Кузьмина М.В., Котова Т.М. ....	767
GENETIC DIVERSITY AND DIFFERENTIATION OF NATURAL AND ARTIFICIAL POPULATIONS OF NORWAY SPRUCE IN THE NORTHWEST OF RUSSIA ESTIMATED BY MICROSATELLITE LOCI, Kalko G. V., Kuzmina M. V., Kotova T. M. ....	768
5. КОЛЛЕКЦИЯ IN VITRO ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ И ТОПОЛЯ КАК ОСНОВА ИХ ДОЛГОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ И УСТОЙЧИВОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА, Машкина О.С., Табацкая Т.М. ....	769
IN VITRO COLLECTION OF VALUABLE BIRCH AND POPLAR GENOTYPES AS A BASIS FOR THEIR LONG-TERM STORAGE AND STABLE REPRODUCTION, Mashkina O. S., Tabatskaya T.M. ....	770
6. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЛОКУСОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ИНФЕКЦИОННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ, Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Пантелеев С.В., Каган Д.И., Ивановская С.И., Можаровская Л.В., Кирьянов П.С., Падутов А.В. ....	771
MOLECULAR-GENETIC SCREENING OF SCOTS PINE LOCI, ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INFECTIOUS DISEASES, Padutov V.E, Baranov O.Yu., Panteleev S.V, Kagan D.I, Ivanovskaya S.I, Mozharovskaya L.V, Kiryanov P.S, Padutov A.V. ....	772
7. РОСТ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ И БЕРЕЗЫ, Жигунов А. В., Шабунин Д. А., Бутенко О. Ю. ....	772
THE GROWTH OF TRANSGENIC ASPEN AND BIRCH, A.V. Zhigunov, D. A. Shabunin, O. Y. Butenko ....	773
8. УСПЕХИ БИОТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ СРЕДСТВ БОРЬБЫ С СОРНЫМИ РАСТЕНИЯМИ, Берестецкий А.О. ....	774
ADVANCES OF BIOTECHNOLOGY IN THE DEVELOPMENT OF WEED CONTROL TECHNIQUES, Berestetskiy A.O. ....	774
9. ЦЕНТР ЛЕСНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ, Вариводина И.Н. ....	775
FOREST BIOTECHNOLOGY CENTER: MODERN STATUS AND DEVELOPMENT PERSPECTIVES, Varivodina I.N. ....	776

УДК 575.826

## АДАПТИВНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЕЛИ

Политов Д.В., Белоконов М.М., Белоконов Ю.С., Мудрик Е.А., Полякова Т.А., Салливан А., Крутовский К.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова  
 Российской академии наук, Москва, Россия,  
 119991, Москва, ул. Губкина, д. 3,  
 dmitri.p17@gmail.com

Приводятся фундаментальные принципы выявления адаптивной генетической изменчивости в популяциях ели и результаты оценки действия естественного отбора в популяциях ели комплекса *Picea abies* – *P. obovata* по новым функциональным геномным маркерам.

**Ключевые слова:** ель, геномные маркеры, естественный отбор, адаптация, ДНК, ОНП, CAPS.

Хвойные древесные растения имеют огромное экологическое и социо-экономическое значение. Традиционные подходы к выявлению селективно важной части генетической изменчивости включают анализ корреляций индивидуальной гетерозиготности с компонентами приспособленности, клинальной изменчивости аллельных и генотипических частот вдоль различных средовых градиентов и идентификацию функционально нагруженных полиморфизмов по необычно высоким или низким уровням межпопуляционной позразделённости (FST С. Райта и аналогичные статистики). Современные вызовы к популяциям хвойных связаны с глобальными климатическими и антропогенными изменениями среды, и они привлекают внимание к выявлению адаптивной генетической изменчивости из современных геномных данных с использованием таких подходов как анализ локусов-аутлаеров (экологических или по уровню генетической дифференциации) среди ОдноНуклеотидных Полиморфизмов (ОНП, SNPs), локализованных в генах с известной функцией, отвечающих за конкретные биохимические и физиологические процессы. Ели комплекса *Picea abies* – *P. obovata* имеют суммарный ареал, наиболее обширный из древесных растений Палеарктики. При этом гибридизация между номинативными видами, европейской и сибирской елью, привела к формированию в плейстоцене и голоцене широкой зоны интрогрессии, что, вероятно, увеличивает адаптивный потенциал всего видового комплекса за счёт взаимодействия генофондов родительских видов. Тестирование ОНП, ранее ассоциированных с ключевыми признаками приспособленности и различными средовыми факторами – перспективное направление выявления генетических основ адаптации у ели. Мы поставили цель проанализировать адаптивную структуру популяций ели с использованием функциональных геномных маркеров (ОНП, скрининг которых осуществляется методами геномики или рутинными процедурами CAPS и dCAPS, основанными на рестрикционном анализе) в кандидатных генах, изменчивость которых связана с вариабельностью средовых факторов и подвергается действию естественного отбора. Для разработки этих маркеров мы использовали данные полного генома ели европейской (Nystedt et al. 2013) и данные частичного секвенирования генома по методу «генотипирование через секвенирование» Genotyping-By-Sequencing (GBS) (Sullivan et al. 2017). На первом этапе мы выявили набор ОНП-аутлаеров, который может быть под действием отбора: 18903 SNPs из GBS (Sullivan et al., 2017) и сравнили 1041 дерево ели: 15279 ОНП были в межгенных регионах, 3624 представляли несинонимичные замены. Особи были сгруппированы согласно двум стратегиям, по первой деревья сгруппированы в 125 популяций по их месту сбора, по второй 748 деревьев были объединены в пять т.н. «видов» (крупных географических групп, выявленных при филогенетическом анализе и анализе коалесценции): «Скандинавия», «Континентальная Европа», «Арктика и Урал», «Obovata» и «Koraiensis». Три подхода были использованы для поиска ОНП-аутлаеров: первый оптимизирован для больших массивов данных, основан на островной модели миграции и реализован в программе LOSITAN; второй использует алгоритм, реализованный в пакете Arlequin, а третий воплощён в программе BayeScan и был использован для набора из 13915 ОНП, локализованных в межгенных регионах генома, используя мультиномиальную модель Диришле. Отобранные на этой стадии 11 CAPS были проанализированы в географических культурах *Picea abies*. На северном участке заложения частоты большинства ОНП, находящихся предположительно под действием дизруптивного отбора, сдвинулись с сторону значений, характерных для *P. obovata*, тогда как на южном участке заложения повысилась концентрация аллелей *P. abies*. Данный эффект был замечен при анализе всего набора ОНП методом главных компонент. Таким образом, этот модельный эксперимент демонстрирует, что насаждения ели имеют динамическую структуру по селективно значимым генам, сформированную в ходе исторического развития, и должны рассматриваться как важные объекты охраны и управления генофондами. Информация о селективной ценности конкретных ОНП может быть использована в селекционных программах по

повышению продуктивности и устойчивости лесных популяций. Работа поддержана проектом РФФИ 15-04-07961 и темами госзадания 0112-2018-0025, 0112-2018-0027 и 0112-2016-0002.

UDC 575.826

## ADAPTIVE GENETIC STRUCTURE IN SPRUCE POPULATIONS

**Politov D.V., Belokon M.M., Mudrik E.A., Polyakova T.A., Sullivan A., Krutovsky K.V.**

*Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, Gubkin str. 3, dmitri.p17@gmail.com*

Fundamental principles of detection of adaptive genetic variation in spruce populations and the results of natural selection action in populations of spruce *Picea abies* – *P. obovata* complex by novel functional genomic markers are presented.

**Ключевые слова:** spruce, functional genomic markers, natural selection, adaptation, DNA, SNP, CAPS.

Conifers are forest tree species of great ecological and socio-economic importance. Traditional approaches for dissection of selectively important genetic component like individual heterozygosity – fitness correlations, detection of clinal variation of allele and genotype frequencies along various environmental gradients and identification of functionally loaded polymorphisms for their low or high values of rate of interpopulation subdivision (Wright's *F<sub>ST</sub>* and analogous measures). Recent challenges to conifer populations caused by global climatic and anthropogenic changes attract attention to revealing adaptive genetic variation from modern genomic data using such approaches as search for environmental or variability outliers among Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) located in genes with known responsible for particular biochemical and physiological responses. Spruces of the *Picea abies* – *P. obovata* complex have vast overall range which is one of the greatest by total area occupied. Hybridization between nominative species of Norway and Siberian spruce and formation during Pleistocene and Holocene of a broad introgression zone putatively increased adaptational potential of the whole complex by admixture of pre-adapted parental gene pools. Testing SNPs previously associated with key adaptive traits and various environmental factors is a promising avenue to study the genetic basis of adaptation in spruce. We aimed to analyze the adaptive structure of spruce populations using functional genomic markers (SNPs analyzed by genomic methods or by routine CAPS and dCAPS technologies based on restrictase digestion) in candidate genes whose variation is associated with variation in the adaptive traits and with environmental variables and is affected by selection. To develop these markers, in addition to already identified SNPs we used the data already obtained from the whole spruce genome (Nystedt et al. 2013) and partial genome Genotyping-By-Sequencing (GBS) (Sullivan et al. 2017) sequencing. In a preliminary study we identified a set of outlier SNPs that could be under selection on a total set of 18,903 SNPs generated from GBS by Sullivan et al. (2017) and comprised 1,041 trees of Norway spruce: 15,279 SNPs were in intergenic regions, and 3,624 SNPs represented non-synonymous nucleotide substitutions. The individuals were grouped based on two grouping strategies. The first was based on grouping 1,041 trees into 125 populations according to their sampling location, and the second on grouping 748 trees into 5 so-called 'species' (large geographic groups revealed by phylogenetic and coalescence analysis): "Scandinavia", "Continental Europe", "Arctic-Ural", "Obovata" and "Koraiensis". Three different approaches were used for the SNP outlier search in Norway spruce populations: 1) approach implemented into the program optimized for large datasets, LOSITAN, that is based on the island model of migration; 2) using the Arlequin software and 3) approach realized in BayeScan software was used for a subset of 13,915 SNPs located in intergenic regions and based on the multinomial - Dirichlet model. The selected at this stage 11 CAPS were screened in *Picea abies* provenance trials. In a northern plot, frequencies of most SNPs subjected to divergent selection tend to shift to values characteristic to *P. obovata* while in a southern plot there was a trend to increase of *P. abies* allele concentrations. This effect is also evident by analysis of combined SNP set by Principal Component Analysis. Thus, as this model experiment demonstrates, a spruce stand has dynamic population structure by selectively important genes formed in course of historical development must be treated as an important object of gene pool conservation. Information of selective value of a particular SNP allele can be used in breeding work for increasing performance and sustainability of forest tree populations. This study was supported by the RFBR project 15-04-07961 and State Budget Themes ## 0112-2018-0025, 0112-2018-0027 and 0112-2016-0002.

УДК 630.416.16:630.174.755

## CORTEX LEVIS VERRUCOSA – ПЕРСПЕКТИВНАЯ ФОРМА ЕЛИ ДЛЯ ЛЕСНОЙ BIOTEХНОЛОГИИ

Иванчина Л.А., Залесов С.В., Кожевников А.П.

Уральский государственный лесотехнический университет, Екатеринбург, Россия  
 620100, Россия, г. Екатеринбург, ул. Сибирский тракт, 37  
 e-mail: ivanchina.ludmila@yandex.ru

Усыхание ельников во многих регионах России и за её пределами вызывает необходимость поиска устойчивых к усыханию селекционных форм ели. В процессе исследований обнаружена новая форма ели по строению коры - гладкая бородавчатая (*Picea 'cortex levis verrucosa' Ivanchina*), которая встречается только среди здоровых деревьев.

**Ключевые слова:** Устойчивость, усыхание, ельники, селекционные формы, *Picea 'cortex levis verrucosa'*.

В последние десятилетия в различных регионах России и за рубежом наблюдается массовое усыхание еловых древостоев [1]. К сожалению, ученым так и не удалось выяснить причины этого явления. Проблема усыхания ельников вызывает необходимость поиска путей минимизации наносимого ущерба. Различные селекционные формы ели характеризуются специфической устойчивостью к определенным неблагоприятным факторам окружающей среды и к заболеваниям [2].

Исследования проводились в зоне хвойно-широколиственных (смешанных) лесов Пермского края. Целью являлось установление селекционных форм ели, наиболее устойчивых к усыханию. Был выбран метод закладки пробных площадей (ПП) [3]. В пределах ПП у каждого дерева определялась категория санитарного состояния [4], тип ветвления и форма коры [5].

В результате было заложено 9 ПП. Санитарное состояние ели во всех исследуемых древостоях неудовлетворительное. Количество сухостоя ели варьирует от 28,4 до 69,6 %.

Согласно результатам исследований, усыханию подвержены деревья ели со всеми типами ветвления кроны. На всех ПП доминируют деревья с чешуйчатым (*cortex rimosus*) типом коры. Редко встречаются деревья ели с продольно-трещиноватым (*cortex longitudinaliter rimosus*) и гладким (*cortex levis*) типами коры. Также нами была обнаружена новая форма ели по строению коры – гладкая бородавчатая (*Picea 'cortex levis verrucosa' Ivanchina*) (рисунок), которая встретилась только на трех ПП. Доля деревьев ели по густоте с указанным типом коры не превышает 4,2 %. Усыханию подвержены деревья ели со всеми формами коры, за исключением деревьев с гладкой бородавчатой корой. Сохранность деревьев ели с гладкой бородавчатой формой коры составляет 100 % на всех ПП, в пределах которых были обнаружены экземпляры ели данной формы.



Рисунок. Ель с гладкой бородавчатой формой коры

Таким образом, *Picea 'cortex levis verrucosa'* является устойчивой к усыханию, а следовательно, перспективной селекционной формой ели для лесной биотехнологии. Разведение *Picea 'cortex levis verrucosa'* позволит создавать плантации устойчивых к усыханию деревьев ели.

Литература:

1. Сазонов А.А., Кухта В.Н., Блинцов А.И. Массовое усыхание еловых лесов Беларуси на рубеже XX – XXI вв. и пути минимизации их последствий // Лесное хозяйство. – 2014. - № 3. – С. 9-12.
2. Лебедев А.В. Корневая губка в рекреационных ельниках и диагностика поражения деревьев // ИВУЗ: Лес-

ной журнал. - 1998. - № 4. – С. 29-35.

3. Данчева А.В., Залесов С.В. Экологический мониторинг лесных насаждений рекреационного назначения. - Екатеринбург: Урал. гос. лесотехн. ун-т, 2015. – 152 с.

4. О правилах санитарной безопасности в лесах [Текст]: Постановление Правительства Российской Федерации от 20.05.2017 г. № 607.

5. Заигралова Г.Н. Лесная селекция. - Саратов: Саратовский ГАУ, 2016. - 80 с.

UDC 630.416.16:630.174.755

## CORTEX LEVIS VERRUCOSA IS A PERSPECTIVE SPRUCE FORM FOR FOREST BIOTECHNOLOGY

Ivanchina L.A., Zalesov S.V., Kozhevnikov A.P.

Ural state forest engineering university, Ekaterinburg, Russia  
620100, Russia, Ekaterinburg, Sibirsky tract, 37  
e-mail: ivanchina.ludmila@yandex.ru

Spruce is drying off in many regions of Russia and beyond its boundaries causes the necessity of stable to drying off selective spruce forms searching. As a result of research a new form of spruce as concerns bark structure – smooth-warty form (*Picea 'cortex levis verrucosa'* Ivanchina), that occurs only among.

**Key words:** stability, drying off, spruce stands, selective forms, *Picea 'cortex levis verrucosa'*.

During the last centuries in various regions of Russia as well as beyond its boundaries mass drying off spruce stands is observed [1]. Unfortunately scientists did not succeed in revealing the cause of the phenomenon. The Problem of spruce stands drying off causes the necessity to find the ways for damage minimization. Various spruce selective forms are characterized by specific stability for definite unfavorable factors of environment as well as for diseases [2].

The investigations have been carried on in Permsky krai coniferous-broadleaved (mixed) forests zones. The object was to determine spruce selective forms stable to drying off. It was established the method of sample plots (SP) laying out [3]. The categories of sanitary state [4], the type of branching and bark form [5] have been determined for every tree within the SP.

As a result 9 SP have been laid out. The sanitary state in all the investigated stands was unsatisfactory. The number of dried off spruce trees is varied from 28,4 % to 69,6 %.

According to the investigation results the trees with all types of crone branching suffer from drying off. On all SP the trees with scale bark type are dominated (*cortex rimosus*). The spruce trees with longitudinally-cracked (*cortex longitudinaliter rimosus*) and smooth (*cortex levis*) bark types are found rarely. We have been succeeded in revealing a new spruce form as concerns its bark structure – smooth-warty (*Picea 'cortex levis verrucosa'* Ivanchina) (figure), that occurs only on three SP. Spruce trees share as concerns the depth with above mentioned bark type do not exceed 4.2 %. Spruce trees with all the bark forms are subjected to drying off, the exclusion are the trees with smooth-warty bark. Preservation of spruce trees with smooth-warty bark constitutes 100 %, on the territory of all SP within the territory of which the spruce trees of the given form has been found.



Figure. Spruce tree with smooth-warty bark form.

In such a way *Picea 'cortex levis verrucosa'* is stable to drying off, and consequently, perspective selective form spruce for forest biotechnology. *Picea 'cortex levis verrucosa'* cultivation makes it possible to form plantations spruce trees stable to drying off.



References:

1. Sazonov A.A., Kukhta V.N., Blintsov A.I. Mass drying of spruce forests of Belarus at the turn of the 20th - 21st centuries and ways to minimize their consequences // *Forestry*. - 2014. - No. 3. - P. 9-12.
2. Lebedev A.V. Root sponge in recreational fir groves and diagnostics of tree damage // *News of universities: Forestry journal*. - 1998. - No. 4. - P. 29-35.
3. Dancheva A.V., Zalesov S.V. Ecological monitoring of forest plantations for recreational purposes. - Ekaterinburg: Ural state forestry university, 2015. - 152 p.
4. On the rules of sanitary security in forests [Text]: Decree of the Government of the Russian Federation of 20.05.2017 No. 607.
5. Zaigralova G.N. Forest selection. - Saratov: Saratov state agrarian university, 2016. - 80 p.

УДК 630:631.524

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ЛИСТВЕННЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

Лебедев В. Г., Шестибратов К.А.

Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пушкино, Россия  
142290, Московская обл., г.Пушкино, пр-т Науки, д.6  
e-mail: vglebedev@mail.ru

Получен ряд трансгенных растений осины и березы с экспрессией различных хозяйственно-ценных генов, перспективных для использования на лесных плантациях целевого назначения.

**Ключевые слова:** лесные плантации, береза, осина, генная инженерия

В последние годы в мире наблюдается устойчивое увеличение площадей под лесными плантациями, продуктивность которых за счет использования новых генотипов намного выше, чем у природных лесов. Возможности традиционных методов в селекции древесных растений достаточно ограничены и в связи с этим все большее значение приобретают методы биотехнологии. В России основными лесообразующими лиственными породами являются береза и осина (15% и 3% площади лесопокрытых земель, соответственно). Обе эти породы являются перспективными для плантационного лесоводства. Генетическая трансформация древесных растений затруднена по сравнению с другими видами, но нами были разработаны эффективные методики агробактериального переноса и на основе плюсовых деревьев был создан ряд трансгенных форм осины (*Populus tremula*) и березы (*Betula pubescens*, *B.pendula*). Устойчивости к гербицидам на основе фосфинотрицина удалось добиться с помощью гена *bar* из почвенной бактерии. С целью увеличения производства древесной биомассы в растения был перенесен ген цитозольной формы глутамин синтетазы GS1, клонированный в нашей лаборатории из *Pinus sylvestris*. Для модификации содержания и/или состава лигнина и целлюлозы в древесине использовали гены ксиланглюканазы *sp-Xeg* и лакказы *Lac* из грибов, а также РНК-интерференционное ингибирование экспрессии гена биосинтеза лигнина 4CL. Проведенные испытания в тепличных и полунатуральных условиях подтвердили перспективность использования полученных генотипов для плантационного лесовыращивания.

UDK 630:631.524

## BIOTECHNOLOGY METHODS FOR DECIDUOUS FOREST TREE BREEDING

Lebedev V. G., Shestibratov K.A.

Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia  
142290, Moscow Region, Pushchino, Science avenue 6  
e-mail: vglebedev@mail.ru

Transgenic aspen and birch plants expressing various economically valuable genes were obtained. These genotypes are promising as planting material for establishment of forest plantations.

**Key words:** forest plantations, birch, aspen, genetic engineering

In recent years there has been increase in the forest plantation area these are much higher productive than

natural forests due to the use of new genotypes. Traditional breeding methods are often constrained by various reasons and biotechnology methods may be the most sustainable approach for creation of new germplasm. In Russia the main forest-forming hardwood tree is birch and aspen, which occupies 15% and 3% of the forested land area, respectively. These trees are promising species for plantation forestry. Genetic transformation of woody plants is difficult compared to annual crops, but we developed effective protocols of agrobacterial gene transfer into aspen and birch genomes and a number of transgenic plants of aspen (*Populus tremula*) and birch (*Betula pubescens*, *B. pendula*) were obtained on the basis of plus trees. To confer resistance to herbicides based on phosphinothricin, the bar gene from the soil bacterium was used. The gene of the cytosolic form of glutamine synthetase GS1, cloned in our laboratory from *Pinus sylvestris*, was used for increasing wood biomass production. Modification of the content and/or composition of lignin and cellulose in wood were obtained using xyloglucanase and laccase genes from fungi, as well RNA interference inhibition of the lignin biosynthesis gene 4CL expression. Testing transgenic plants under greenhouse and semi-natural conditions confirmed its potential suitability for establishment of forest plantations.

УДК 630.165.4; 630.174.754:575.174.05.3; 630.174.755:174.015.3

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИРОДНЫХ И ИСКУССТВЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

Калько Г.В., Кузьмина М.В., Котова Т.М.

Федеральное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский институт лесного хозяйства», Санкт-Петербург, Россия  
194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21  
e-mail: kagava0720@gmail.com

Был проведен анализ в пяти полиморфных ядерных SSR локусах в трех географически различающихся естественных и двух искусственных популяциях *Picea abies*. Были оценены ожидаемая ( $H_e$ ) и наблюдаемая ( $H_o$ ) гетерозиготности, индексы фиксации Райта. Доля межпопуляционной изменчивости по результатам статистической обработки индексов  $F_{st}$  (AMOVA) составляла 5 %.

**Ключевые слова:** n-SSR маркеры, ель европейская, наблюдаемая гетерозиготность, ожидаемая гетерозиготность, индексы фиксации Райта

Микросателлитный анализ в ядерных локусах Pa\_28, Pa\_36, Pa\_41, Pa\_59 и UAPgAG105 [1, 2] проводили в образцах ДНК ели европейской из тихвинской, порховской и гатчинской естественных популяций и в семьях (полусибсы) 455 и 512 из испытательных культур г. Гатчина Ленинградской области.

ДНК выделяли методом со СТАВ с модификациями [3]. ПЦР проводили по методике, предложенной S. Fluch и соавторами [1]. Прямые праймеры были помечены флуоресцентными красками FAM, HEX и ROX. Результаты ПЦР визуализировали с помощью фрагментного анализа на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500, Applied Biosystems, с использованием программы GeneMapper. Был использован размерный стандарт GeneScan™ 600 LIZ™.

Для вычисления популяционных характеристик использовали программу GenAlEx 6.503 [4]. Кластерный анализ (UPGMA) на основе значений коэффициентов генетических расстояний Nei ( $DN$ ) и тест на нейтральность Эвенса-Ваттерсона были выполнены в программе PopGene32 (<https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>).

Все использованные микросателлитные локусы полиморфны ( $P = 100\%$ ).

В естественных насаждениях ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ ) составляла в популяциях г. Тихвин, г. Порхов и г. Гатчина 0,421, 0,435 и 0,414, наблюдаемая гетерозиготность ( $H_o$ ) - 0,413, 0,437 и 0,407, соответственно. Ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготности в семьях 455 и 512 были несколько выше и достигали  $H_e$  - 0,440 и 0,493,  $H_o$  - 0,540 и 0,503, соответственно. Как тенденцию можно отметить, что эффективное число аллелей на локус  $N_a$ , которое можно рассматривать как меру генетического разнообразия, также несколько выше у полусибсов.

Индекс фиксации  $F$  [5] в природных насаждениях имел положительные значения, близкие к нулю: от 0,012 до 0,015. У полусибсов были отмечены отрицательные индексы фиксации -0,208 и -0,033, что указывает на избыток гетерозиготности, существенный у семьи 455.

Низкие попарные значения  $F_{st}$  (от 0,003 до 0,085) свидетельствуют о том, что между изучаемыми по-

пуляциями ели европейской наблюдается интенсивный генный поток.

Дисперсионный анализ (AMOVA) индексов фиксации  $F_{st}$  и  $R_{st}$  выявил долю межпопуляционной изменчивости 5 % и 12 %, соответственно.

Литература:

- 1 Fluch, S. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.) / S. Fluch [et al.] // BMC Research Notes. – 2011. – 12 October. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/401>. – Загл. с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения: 28.04.2015.
- 2 Hodgetts, R.B. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species / R.B. Hodgetts, M.A. Aleksiuik, A. Brown, C. Clarke, E. Macdonald, S. Nadeem, D. Khasa // Theor Appl Genet. – 2001. – Vol. 102. – P. 1252-1258. – ISSN 0040-5752.
- 3 Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochem. Bull. – 1987. – Vol. 19. – P. 11-15.
- 4 Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, and P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288-295. – Online ISSN: 1471-8286.
- 5 Wright, S. The genetical structure of populations / S. Wright // Annals of Eugenics. – 1951. – Vol. 15 (4). – P. 323-354. – ISSN 0003-4800.168.

UDC 630.165.4; 630.174.754:575.174.05.3; 630.174.755:174.015.3

## GENETIC DIVERSITY AND DIFFERENTIATION OF NATURAL AND ARTIFICIAL POPULATIONS OF NORWAY SPRUCE IN THE NORTHWEST OF RUSSIA ESTIMATED BY MICROSATELLITE LOCI

Kalko G. V., Kuzmina M. V., Kotova T. M.  
Saint Petersburg Forestry Research Institute  
194021, St. Petersburg, Institutsky pr., 21  
e-mail: kagava0720@gmail.com

The analysis of five polymorphic nSSR loci of *Picea abies* in three natural and two artificial geographically different populations in the Northwest Region of Russia was carried out. The expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosity and Wright's fixation indices were estimated. The analysis of molecular variance  $F_{st}$  (AMOVA) revealed 5 % genetic differentiation between populations.

**Key words:** n-SSR loci, Norway spruce, observed heterozygosity, expected heterozygosity, Wright's fixation indices

Microsatellite analysis of nuclear SSR loci Pa\_28, Pa\_36, Pa\_41, Pa\_41 and UAPgAG105 [1, 2] was investigated in DNA samples from Tihvin, Porhov and Gatchna natural population and in tree families (half sibs) 455 and 512 from Norway spruce plantation with selectively improved properties in Gatchina.

DNA was extracted by CTAB method with modifications [3]. PCR was performed as described by S. Fluch with co-authors [1]. The forward primers were labeled by FAM, HEX and ROX fluorescent paints. The results of PCR were visualized with using fragment analysis by ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Fragment sizes were evaluated with GeneMapper programme. GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard was used.

Population characteristics were calculated with using GenAlEx 6.503 software application [4]. Cluster analysis (UPGMA) based on the values of Nei's genetic distance and Evens-Watterson test of neutrality were performed with the help of the program Popgene32.

All tested microsatellite loci were polymorphic ( $P = 100\%$ ).

The expected heterozygosity ( $H_e$ ) in the natural populations of Tihvin, Porhov and Gatchina was 0,421, 0,435 and 0,414, the observed heterozygosity ( $H_o$ ) was 0,413, 0,437 and 0,407, correspondingly. The expected ( $H_e$ ) and observed ( $H_o$ ) heterozygosity in tree families 455 and 512 was just over and amounted 0,440 and 0,493 ( $H_e$ ), 0,540 and 0,503 ( $H_o$ ), respectively. As a trend it can be noted that the effective number of alleles ( $N_a$ ), which could be considered as a characteristic of diversity, was a little higher in artificial populations.

Wright's fixation index  $F$  [5] in natural populations has a positive value close to null (from 0,012 to 0,015), and was negative in families 455 (-0,208) and 512 (-0,033). It indicates excess heterozygosity in both artificial populations. The excess heterozygosity in family 455 was essential in comparison with the other variants.

The low pairwise  $F_{st}$  (from 0,003 to 0,085) testifies to gene flow between the studied populations.

The analysis of variance (AMOVA) of fixation indices  $F_{st}$  and  $R_{st}$  defined the ratio of molecular variance among the populations in 5 % and 12 %, correspondingly.

## References:

- 1 Fluch, S. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.) / S. Fluch [et al.] // BMC Research Notes. – 2011. – 12 October. – <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/401>.
- 2 Hodgetts, R.B. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species / R.B. Hodgetts, M.A. Aleksasuk, A. Brown, C. Clarke, E. Macdonald, S. Nadeem, D. Khasa // Theor Appl Genet. – 2001. – Vol. 102. – P. 1252-1258. – ISSN 0040-5752.
- 3 Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochem. Bull. – 1987. – Vol. 19. – P. 11–15.
- 4 Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, and P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288-295. – Online ISSN: 1471-8286.
- 5 Wright, S. The genetical structure of populations / S. Wright // Annals of Eugenics. – 1951. – Vol. 15 (4). – P. 323-354. – ISSN 0003-4800.168.

УДК 630\*161.443.6 + 674.031.632.13

## КОЛЛЕКЦИЯ IN VITRO ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ БЕРЕЗЫ И ТОПОЛЯ КАК ОСНОВА ИХ ДОЛГОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ И УСТОЙЧИВОГО ВОСПРОИЗВОДСТВА

Машкина О.С.<sup>1,2</sup>, Табацкая Т.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Всероссийский НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж, Россия 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, д.105

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия 394018, Воронеж, Университетская пл., д.1

e-mail: mashkinaos@mail.ru

Показана возможность долгосрочного хранения in vitro (в течение 2-26 лет) с использованием безгормональных питательных сред 19 клонов березы и 6 клонов тополя с сохранением их биотехнологических параметров, генетических и селекционных особенностей исходных экземпляров при посадке микропрорастений в почву.

**Ключевые слова:** коллекция клонов березы и тополя, хранение in vitro, клональное микроразмножение, тестирование in vitro и ex vitro.

Длительное поддержание in vitro коллекции клонов хозяйственно-ценных, но трудно размножаемых биотипов листовых древесных растений (быстрорастущих, продуктивных, устойчивых, с высоким качеством древесины, декоративных) – один из эффективных подходов их сохранения (консервации ex situ). Коллекция 19 клонов березы (*Betula pendula* L., *B. pendula* Roth var. *carelica* Merkl., *B. pendula* "dalekarlica" (L.f.), *B. pubescens* Ehrh.) и 6 клонов тополя (*Populus alba* L., *P. canescens* Sm.) поддерживается нами на протяжении 2-26 лет путем редкого субкультивирования (один рез в 5-6 месяцев) при обычных условиях климатического режима (+25 ...+26° С, фотопериод 16 часов, интенсивность освещения 1,0-2,0 клк) на питательных средах без гормонов с периодической проверкой характеристик коллекционного материала и посадкой растений в почву. Это устойчиво пролиферирующие культуры, адаптированные к условиям культивирования in vitro, сохраняющие ценные признаки и свойства исходных экземпляров. В процессе длительного культивирования все клоны демонстрировали высокую жизнеспособность, регенерационную активность и ювенильность; сохраняли плоидность (2n=2x=28, 2n=3x=42 или 2n=4x=56 – береза, 2n=2x=38 или 2n=3x=57 – тополь) и молекулярно-генетические особенности исходных экземпляров. Не проявляли видимых признаков соматоклональной изменчивости. Напротив, мутантные клоны березы (представляющие интерес для изучения генетики морфогенеза) сохраняли свой отклоняющийся от нормы фенотип. Полевые испытания (в теплице и питомнике) клонов березы и тополя после длительного (от года до 25 лет) культивирования in vitro демонстрируют их высокую приживаемость (75-96%) и сохранность (80-97%), внутриклоновую однородность и идентичность исходным экземплярам (по особенностям роста, габитусу, качеству древесины, плоидности и молекулярно-генетическим особенностям) [1-3]. Это создает основу использования коллекции in vitro для сохранения ex situ и устойчивого воспроизводства ценных генотипов березы и тополя, а также для их селективного массового тиражирования и выращивания посадочного материала для создания лесных культур целевого назначения.

## Литература:

1. Машкина О.С., Буторина А.К., Табацкая Т.М. Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) как модель для изучения генетической и эпигенетической изменчивости при формировании узорчатой древесины // Генетика. – 2011. – Т. 47, № 8 – С. 1073–1080.
2. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Морковина С.С., Панявина Е.А. Выращивание посадочного материала тополя белого (*Populus alba* L.) на основе коллекции *in vitro* и оценка его себестоимости // Лесотехнический журнал. – 2016. – №1. – С. 28-44.
3. Машкина О.С., Федулова Т.П., Табацкая Т.М., Кондратьева А.М., Шабанова Е.А. Молекулярно-генетическая и цитогенетическая оценка перспективных гибридов и размноженных *in vitro* клонов тополя и осины // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: химия, биология, фармация. – 2016. – №2. – С. 60-69.

УДК 630\*161.443.6 + 674.031.632.13

## IN VITRO COLLECTION OF VALUABLE BIRCH AND POPLAR GENOTYPES AS A BASIS FOR THEIR LONG-TERM STORAGE AND STABLE REPRODUCTION

 Mashkina O. S.<sup>1,2</sup>, Tabatskaya T.M.<sup>1</sup>
<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Voronezh, Russia 394087, Voronezh, Lomonosov str., 105

<sup>2</sup> Voronezh State University, Voronezh, Russia 394018, Voronezh, Universitetskaya pl., 1  
 e-mail: mashkinaos@mail.ru

Possibility of the long-term *in vitro* storage (during 2-26 years) using a hormone-free media has been demonstrated based on 19 birch 6 poplar clones with preservation of their biotechnological, genetic and breeding characteristics when planting in the soil.

**Key words:** collection of birch and poplar clones, *in vitro* storage, clonal micropropagation, *in vitro* and *ex vitro* tests.

The long-term storage of *in vitro* clones collection is one of the most efficient approaches for the *ex situ* conservation of valuable deciduous tree biotypes (of the fast-growing, productive, high wood quality, resistant and *ornamental plants*). For 2-26 years, we have been maintaining the collection of 19 birch clones (*Betula pendula* L., *B. pendula* Roth var. *carelica* Merkl., *B. pendula* "dalekarlica"(L.f.), *B. pubescens* Ehrh.) and 6 poplar clones (*Populus alba* L., *P. canescence* Sm.) under the regular climate conditions (+25 ...+26° C, at an illuminance of 1,0-2.0 klx for 16 h per day) and rare subcultivation (once in 5-6 months) on hormone-free media, with periodic control of their characteristics and planting the specimens in the ground. They represent stability proliferating cultures adapted to *in vitro* cultivation and preserving valuable features of the original plants. During the long-term cultivation all of the clones have demonstrated high viability, regeneration activity and juvenility; ploidy (2n=2x=28, 2n=3x=42 or 2n=4x=56 – birch, 2n=2x=38 or 2n=3x=57 – poplar) as well as molecular and genetic peculiarities of the original specimens. There were no visible signs of somaclonal variability. On the contrary, a mutant birch clones (that would be of interest for studies on the genetics of morphogenesis) has preserved its aberrant phenotype. Field trials (in the greenhouse and nursery garden) of the birch and poplar clones during long-term *in vitro* storage (from 1 up to 25 years) have shown their high survival and preservation ability (75-97 %), revealed their intracolon homogeneity and their identity to original specimens (in growth features, habitus, wood quality, ploidy, molecular *characteristics*). This provides the basis for using of *in vitro* collection for *ex situ* conservation and stable reproduction of valuable birch and poplar genotypes, as well as for the selective mass clonal micropropagation and growth of planting stock for forest plantation.

## References:

1. Mashkina O. S., Butorina A. K., Tabatskaya T. M. Karelian birch (*Betula pendula* Roth. var. *carelica* Merkl.) as a model for studying genetic and epigenetic variation related to the formation of patterned wood // Russian Journal of Genetics. – 2011. – Vol. 47, No. 8. – P. 951–957.
2. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Morkovina S.S., Panyavina E.A. Growing seedlings white poplar (*Populus alba* L.) based on the collection *in vitro* and evaluation of its cost // Forest Technical Journal. – 2016. – No. 1. – P. 28–44.
3. Mashkina O. S., Fedulova T. P., Tabatskaya T. M., Kondratyeva A. M., Shabanova E. A. Molecular genetic and cytogenetic evaluation of perspective hybrids and propagated *in vitro* clones of poplar and aspen // Proceeding of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. – 2016. – No.2. – P. 60–69.

УДК 575.174.015.3:575.83

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЛОКУСОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ИНФЕКЦИОННЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Пантелеев С.В., Каган Д.И., Ивановская С.И., Можаровская Л.В., Кирьянов П.С., Падутов А.В.

Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Беларусь  
246050, Беларусь, Гомель, ул. Пролетарская, 71  
e-mail: forestgen@mail.ru

Проведена функциональная аннотация транскриптомов проростков сосны обыкновенной, на основе данных высокопроизводительного секвенирования. Идентифицировано восемь локусов, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам: GH19, Hsp70, Hsp90, AMP, CBP, AAI-LTSS, PsACRE, SS/AF.

**Ключевые слова:** сосна обыкновенная, устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам, высокопроизводительное секвенирование

Устойчивость растений к патогенным микроорганизмам главным образом обусловлена барьерными свойствами различных морфолого-анатомических структур, метаболитов и физиологических реакций. Генетические детерминанты устойчивости к фитопатогенным организмам зачастую имеют полигенный характер и представляют собой комплексную систему, сложившуюся в ходе коэволюции древесных растений и фитопатогенных микроорганизмов. Отличительной особенностью функционирования механизмов, связанных с общей системной устойчивостью, является их взаимосвязь с общим физиологическим статусом растений – изменение которого может негативно отражаться на барьерных функциях отдельных тканей и органов.

Одним из современных подходов к изучению полигенных признаков является анализ результатов высокопроизводительного секвенирования транскриптомов среди альтернативных (по различным признакам) групп индивидов.

Сосна обыкновенная является одной из главных лесообразующих пород Беларуси – удельная площадь сосновых насаждений в республике составляет ≈50% от всего лесного фонда. За последние десятилетия в лесном хозяйстве Беларуси отмечаются негативные тенденции, связанные с обострением фитопатологической ситуации в сосновых насаждениях, что вызвано длительным отрицательным воздействием целого комплекса абиотических, биотических и антропогенных факторов на лесные ценозы. При этом увеличение числа случаев возникновения фитозаболеваний отмечается для различных возрастных групп растений, что указывает на неспецифичный характер инфекционных болезней, возникающих как следствие снижения биологической устойчивости растительных организмов.

Инфекционное полегание сеянцев – распространенное заболевание посадочного материала сосны обыкновенной, и является удобным модельным объектом для выявления и изучения локусов, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам.

В результате проведенного высокопроизводительного секвенирования препаратов суммарной кДНК проростков сосны обыкновенной, асимптоматичных по отношению к инфекционному полеганию, были отобраны EST-маркеры, характеризующиеся наибольшим уровнем экспрессионной активности. Последующий анализ полученных результатов в базе данных GenBank NCBI позволил идентифицировать в транскриптоме семейства генов, ассоциированных с устойчивостью к фитопатогенным микроорганизмам: гликозил-гидролазы (GH19), белков теплового шока Hsp70 и Hsp90, антимикробных полипептидов (AMP), кальций-связывающих белков (CBP); ингибиторов альфа-амилазы, липидтранспортирующих белков, запасных белков семян (AAI-LTSS). Также, были идентифицированы два EST-маркера с неустановленной функцией, характеризующиеся высоким уровнем сходства с последовательностями ранее описанных генов устойчивости PsACRE и полипептидов, обладающих антигрибковой активностью (SS/AF).

На основе полученных данных разработан набор праймеров для проведения скрининга экспрессии локусов, ассоциированных с устойчивостью к инфекционным заболеваниям сосны обыкновенной.

UDC 575.174.015.3:575.83

## MOLECULAR-GENETIC SCREENING OF SCOTS PINE LOCI, ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INFECTIOUS DISEASES

**Padutov V.E, Baranov O.Yu., Panteleev S.V, Kagan D.I, Ivanovskaya S.I, Mozharovskaya L.V, Kiryanov P.S, Padutov A.V.**

*Forest Research Institute of the NAS of Belarus, Homiel, Belarus  
246050, Belarus, Homiel, Proletarskaya str., 71  
e-mail: forestgen@mail.ru*

Functional annotation of Scots pine seedlings transcripts was carried out on the basis of NGS data. Eight loci, associated with resistance to phytopathogenic microorganisms, have been identified: GH19, Hsp70, Hsp90, AMP, CBP, AAI-LTSS, PsACRE, SS/AF.

**Key words:** Scots pine, resistance to phytopathogenic microorganisms, next generation sequencing

The resistance of plants to pathogenic microorganisms is mainly due to the barrier properties of various morphological-anatomical structures, metabolites and physiological responses. Genetic determinants of resistance to phytopathogenic organisms are often of a polygenic nature and represent a complex system formed during the co-evolution of woody plants and phytopathogenic microorganisms. A distinctive feature of the functioning of the mechanisms associated with the total system resistance is their interrelation with the general physiological status of plants - the change of which can negatively affect the barrier functions of individual tissues and organs.

One of the modern approaches to the study of polygenic traits is the analysis of the results of next generation sequencing of transcripts among alternative (by different characters) groups of individuals.

Scots pine is one of the main forest-forming species of Belarus - the area of pine stands in the republic is ≈50% of the total forest fund. Over the past decades, forestry in Belarus has been experiencing negative trends related to exacerbation of the phytopathological situation in pine stands, which is caused by a long negative impact of a whole complex of abiotic, biotic and anthropogenic factors on forest cenoses. At the same time, an increase in the number of cases of phytoecological emergence is noted for various age groups of plants, which indicates the nonspecific nature of infectious diseases that result from a decrease in the biological resistance of plant organisms.

Infectious lodging of seedlings is a common disease of Scots pine, and is a convenient model object for identifying and studying loci, associated with resistance to phytopathogenic microorganisms.

Next generation sequencing of cDNA libraries of Scots pine seedlings (asymptomatic to infectious lodging) was carried out. EST markers with the highest level of expression activity were selected. Analysis of the obtained results in the GenBank NCBI database allowed to identify in the transcriptome the gene families, associated with resistance to phytopathogenic microorganisms: glycosylhydrolase (GH19), heat shock proteins Hsp70 and Hsp90, antimicrobial polypeptides (AMP), calcium-binding proteins (CBP); alpha-amylase inhibitors, lipid transport proteins, seed storage proteins (AAI-LTSS). Also, two EST markers with an unidentified function were noted, characterized by a high degree of similarity to the sequences of the previously described PsACRE resistance genes and polypeptides having antifungal activity (SS/AF).

On the basis of the obtained data, a set of primers has been developed for screening the expression of loci, associated with resistance to infectious diseases of Scots pine.

УДК 577.21:630

## РОСТ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ И БЕРЕЗЫ

**Жигунов А. В., Шабунин Д. А., Бутенко О. Ю.**

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова», Санкт-Петербург, Россия  
e-mail: a.zhigunov@bk.ru*

Испытаны в условиях закрытого грунта трансгенные формы березы и осины, обладающие повышенной продуктивностью. Из испытанных более 40 линий березы и 6 линий осины выделены по 2 линии показавшие устойчивое превышение в росте над контрольными экземплярами.

**Ключевые слова:** береза, осина, трансгенные растения, глутаминсинтетаза

Создание быстрорастущих форм древесных растений является актуальным направлением для ускоренного получения древесины в лесном хозяйстве.

На сегодняшний день научным коллективом под руководством К.А. Шестибрatова (Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) созданы трансгенные растения осины (*Populus tremula* L.) и березы (*Betula pendula*) с генами глутаминсинтетазы сосны, обладающие повышенной продуктивностью. Преимущества таких растений особенно проявляются на почвах, где ограниченность запасов азота является лимитирующим фактором.

Наблюдения за полученными растениями в условиях закрытого грунта проводились на протяжении 5 лет.

Растения базовых генотипов были использованы в качестве контроля.

Две линии трансгенной березы (F14GS6a, F16GS4a) в 5-летнем возрасте показали значительный рост по диаметру (на 66 и 46 %, соответственно) и высоте (30 и 20 %, соответственно). Расчет t-критерия Стьюдента для двух независимых выборок показал, что различия по данным показателям достоверны ( $p < 0,05$ ).

Две линии трансгенной осины (PtV22XGS (8)2, PtV22IXGS (6)8) в 5-летнем возрасте также демонстрировали значительный рост по линейным параметрам (по диаметру на 58 и 55 %, соответственно, по высоте на 60 и 30 %, соответственно). Что подтверждается расчетом t-критерия Стьюдента для двух независимых выборок (различия достоверны на уровне  $p < 0,05$ ).

U.D.K. 577.21:630

## THE GROWTH OF TRANSGENIC ASPEN AND BIRCH

**A.V. Zhigunov, D. A. Shabunin, O. Y. Butenko**

*Saint-Petersburg State Forest Technical University named after S.M. Kirov St. Petersburg, Russia, e-mail: a.zhigunov@bk.ru*

Transgenic forms of aspen and birch growth with root-balled tree system which are notable for increase productivity were tested. From more than 40 tested lines of birch and 6 lines of aspen 2 lines were selected which showed stable increasing in growth over control trees.

**Key words:** birch, aspen, transgenic trees, glutamine synthetase.

Creation of fast-growing forms of forest trees is an actual tendency for the accelerated directions of wood in the forestry.

Nowadays research team under the direction of K.A. Shestibratov (Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS) created transgenic aspen (*Populus tremula* L.) and birch (*Betula pendula*) with glutamine synthetase genes of Scots pine, which showed increased productivity. Advantages of such trees shows especially on the soils, where nitrogen is a limiting factor.

Observations of the creation trees with root-balled trees system were conducted during 5 years.

Plants with basic genotypes were used as a control.

Two lines of transgenic birch (F14GS6a, F16GS4a) at the age of 5 years showed substantial growth in DBH (66 and 46 % accordingly) and in height (30 and 20 % accordingly). Calculation of Student's t-test for independent samples showed that significant differences ( $p < 0,05$ ).

Two lines of transgenic aspen (PtV22XGS (8)2, PtV22IXGS (6)8) at the age of 5 years also showed substantial growth in DBH (58 and 55 % accordingly) and in height (60 and 30 % accordingly). Calculation of Student's t-test for independent samples showed that significant differences ( $p < 0,05$ ).



УДК 632.51

## УСПЕХИ БИОТЕХНОЛОГИИ В РАЗРАБОТКЕ СРЕДСТВ БОРЬБЫ С СОРНЫМИ РАСТЕНИЯМИ

**Берестецкий А.О.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
 Санкт-Петербург, Россия  
 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3  
 e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru*

Ни в органическом, ни в интенсивном земледелии получение высоких урожаев невозможно без борьбы с сорными растениями. В докладе рассмотрены различные возможности использования методов биотехнологии в разработке способов борьбы с нежелательной растительностью.

**Ключевые слова:** сорные растения, биотехнология, трансгенные сорта, аллелопатия, биогербициды, биорациональные гербициды

Засоренность полей – постоянная проблема в посевах многих сельскохозяйственных культур, особенно в органическом земледелии. Без борьбы с сорными растениями получение высоких урожаев сельскохозяйственных культур невозможно: при сильной засоренности посевов многие другие затратные мероприятия (использование урожайных сортов, удобрений) оказываются бессмысленными. Ведущие агрохимические компании уделяют большое внимание разработке новых химических средств борьбы с сорными растениями, однако гербициды с новыми механизмами давно не выводились на рынок. В РФ гербициды с действующими компонентами собственной разработки не выпускаются. Взамен этого большое внимание уделяется смесевым препаратам на основе «джереников» для преодоления резистентности и расширения спектра биологической активности гербицидов. Помимо сорных растений, большой проблемой являются инвазивные виды растений, которые встречаются не только в посевах сельскохозяйственных культур, но и на непахотных землях, рекреационных зонах. Достижения биотехнологии традиционно используются в создании трансгенных сортов устойчивых к гербицидам, с аллелопатическими свойствами, а также в разработке биологических и биорациональных гербицидов. Плюсы и минусы применения неселективных гербицидов в посевах нечувствительных к ним культур широко обсуждается в связи с появлением резистентных к ним сорных растений. Создание таких сортов – теоретически и практически отработанный процесс, однако в РФ их использование запрещено. Интересны исследования по изучению аллелопатических свойств культурных растений. Возможно создание трансгенных сортов, синтезирующих стимуляторы прорастания паразитических растений, которые, не найдя растение-хозяин, погибают. В ходе разработки биогербицидов – препаратов на основе фитопатогенных микроорганизмов широко используются методы традиционной биотехнологии (селекция продуцентов, оптимизация состава питательных сред, создание товарных форм и прочие). При помощи генной инженерии возможно создание гипервирулентных фитопатогенов, являющихся продуцентами биогербицидов. Методы традиционной биотехнологии и генной инженерии могут быть использованы и для конструирования суперпродуцентов фитотоксинов, обладающих гербицидным потенциалом. Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 16-16-00085).

UDK 632.51

## ADVANCES OF BIOTECHNOLOGY IN THE DEVELOPMENT OF WEED CONTROL TECHNIQUES

**Berestetskiy A.O.**

*All-Russian Institute of Plant Protection,  
 Saint-Petersburg, Russian Federation  
 196608 Saint-Petersburg, Pushkin, Podbelskogo road, 3  
 E-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru*

Farmers cannot ignore weed control to obtain high crop yields. Different applications of biotechnology achievements to suppress weeds are presented.

**Key words:** weeds, biotechnology, transgenic varieties, allelopathy, bioherbicides, biorational herbicides

Crop infestation with weeds is a common and continuous problem especially in the organic farming. High yields of crops without weed control are impossible: at high weed density many plant growth technologies (for instance, use of productive varieties or fertilizers) are senseless. Leading agrochemical companies pay considerable attention to the development of chemical herbicides however the release of new classes of these chemicals is being delayed. In Russian Federation such investigations are still very restricted. Instead, the attention is paid to mixtures of herbicides based on generic compound to combat resistance and widen control spectrum. In addition to weeds, invasive plant species are serious problem both on arable and non-arable land and in recreation zones. For a long time, biotechnology achievements are useful for engineering herbicide-tolerant crops, breeding allelopathy varieties, development of biological and biorational herbicides. The discussion on the safety of herbicide-tolerant crops as well as on high application levels of non-selective herbicides varies lasts for many years. Despite they are available and the technology is well established, the use of transgenic plants is prohibited in Russian Federation. There are wide possibilities for classical genetics as well for genetic engineering to develop allelopathic crop varieties. It can be interesting to combat parasitic plants if their non-host crops produce their germination stimulators. For development of microbial herbicides, the traditional biotechnology approaches are widely used as for example: strain selection, media optimization, formulation approaches. Genetic engineering can be used for the construction of hypervirulent strains of phytopathogens specific to weeds. Both traditional and molecular biotechnology can be very useful for selection or construction of over-producers of phytotoxins having high herbicidal potential. The research is supported by Russian Science Foundation (grant № 16-16-00085).

УДК 630\*742

## ЦЕНТР ЛЕСНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Вариводина И.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», Воронеж, Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105  
E-mail: biotechcenter@lesgen.vrn.ru

Представлено современное состояние работы Центра лесных биотехнологий ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех», осуществляющего научно-методическую координацию деятельности в области лесных биотехнологий в целях развития и внедрения биотехнологий в практику лесного хозяйства.

**Ключевые слова:** лесная биотехнология, координация, эксперты, совет, нормативные документы.

Центр лесных биотехнологий ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» создан во исполнение пункта 58 «Создание центра лесных биотехнологий» Плана мероприятий («дорожной карты») «Развитие биотехнологий и геномной инженерии», утвержденного распоряжением Правительства Российской Федерации от 18.07.2013 № 1247-р, планом графиком исполнения мероприятий по развитию биотехнологий и геномной инженерии, утвержденным 20 августа 2013 года заместителем Министра природных ресурсов и экологии Российской Федерации – руководителем Федерального агентства лесного хозяйства. В 2014 году создан постоянно действующий совещательный орган, осуществляющий научно-методическую координацию деятельности в области лесных биотехнологий – межведомственный научно-координационный совет (МНКС) «Центра лесных биотехнологий». По основным направлениям деятельности Совета созданы экспертные рабочие группы. Осуществляется координация деятельности по формированию перечня фундаментальных и проблемно-ориентированных и прикладных исследований в области лесной биотехнологии ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех». Ведется работа по созданию электронной базы генетического банка биокolleкции, объединяющего криобанки хранения ДНК, коллекции растений *in vitro*, а также коллекции биотехнологических форм лесных пород. Утверждено Положение о коллекции *in vitro* лесных древесных растений в структуре «Центра лесных биотехнологий». Цель данного документа – создание основы (в том числе, доступных информационных ресурсов о действующих на территории РФ коллекциях *in vitro*) для более эффективного взаимодействия научных сотрудников и специалистов, работающих в научных организациях разных ведомств РФ, занимающихся вопросами сохранения и воспроизводства лесных генетических ресурсов методами биотехнологии. Создан и постоянно обновляется информационный портал Центра лесных биотехнологий, на котором размещаются все принятые Советом документы, идёт обсуждение про-

ектов документов и вносятся предложения по деятельности Центра и Совета ЦЛБ. В сентябре 2014 г. Центр лесных биотехнологий ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» принят в члены Научно-технического Некоммерческого Партнерства «Технологическая Платформа БиоТех2030». Подписано соглашение о взаимодействии между ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» и ФГБУН ФИБХ РАН» при создании межведомственной проблемной лаборатории лесной биотехнологии. Подписан договор о научно-техническом сотрудничестве с Институтом леса Национальной академии наук Беларуси на период 2017 – 2020 гг. Помимо координирующих и организационных мероприятий, Центр лесных биотехнологий в рамках государственного задания на 2017-2019 г.г. проводит фундаментальные и проблемно-ориентированные прикладные научно-исследовательские работы с перспективными лесными породами, направленные на решение задач, предусмотренных планом мероприятий («дорожной картой») «Развитие биотехнологий и генной инженерии».

Перспективы развития Центра лесных биотехнологий:

В области научных исследований: Биотехнология: Сохранение и воспроизводство представителей ценного генофонда лиственных древесных растений на основе биотехнологий. Внедрение эффективных биотехнологических разработок ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех» в практику лесного хозяйства, научное сопровождение создания плантаций быстрорастущего леса для целей лесной промышленности и биоэнергетики. Генетика и селекция: Выделение исходного генетического материала, изучение наследования хозяйственно ценных признаков и создание постоянной лесосеменной базы основных лесообразующих и интродуцированных древесных пород. Получение новых генотипов лесных древесных растений для пополнения имеющихся коллекций ценного генофонда, так и создания новых.

UDC 630 \* 742

## FOREST BIOTECHNOLOGY CENTER: MODERN STATUS AND DEVELOPMENT PERSPECTIVES

Varivodina I.N.

*Federal State Budgetary Institution "All-Russian Scientific Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology", Voronezh, Russia, 394087, Voronezh, Lomonosov St. 105  
E-mail: biotechcenter@lesgen.vrn.ru*

The present state of the work of the Forest Biotechnology Center of the FGBU VNIILGISbiotekh is presented, which carries out scientific and methodological coordination of activities in the field of forest biotechnologies for the development and introduction of biotechnologies into forestry practices.

**Key words:** forest biotechnology, coordination, experts, council, normative documents.

The Forest Biotechnology Center of the VNIILGISbiotekh FGBU was created pursuant to paragraph 58 "Establishment of a Forest Biotechnology Center" of the Action Plan ("roadmap") "Development of Biotechnology and Genetic Engineering" approved by the decree of the Government of the Russian Federation No. 1247-r dated July 18, 2013, schedule implementation of activities for the development of biotechnology and genetic engineering, approved on August 20, 2013 by the Deputy Minister of Natural Resources and Ecology of the Russian Federation - the head of the Federal Forestry Agency. In 2014, a permanent advisory body was created to carry out scientific and methodological coordination of activities in the field of forest biotechnology - the Interdepartmental Scientific Coordinating Council (ISCC) of the Forest Biotechnology Center. Expert working groups have been established in the main areas of the Council's activities. Coordination of activities on the formation of a list of fundamental and problem-oriented and applied research in the field of forest biotechnology of the FGBU VNIILGISBIOTECH is being carried out. Work is underway to create an electronic database of a genetic bank for bioconciliation, combining cryobanks for storing DNA, plant collections in vitro, and collections of biotechnological forms of forest species. The Regulations on the collection of in vitro forest tree plants in the structure of the "Forest Biotechnology Center" have been approved. The purpose of this document is to create a framework (including accessible information resources on in vitro collections in the Russian Federation) for more effective interaction of researchers and specialists working in scientific organizations of different departments of the Russian Federation dealing with the conservation and reproduction of forest genetic resources using biotechnology methods. The information portal of the Forest Biotechnology Center has been created and is constantly updated. All the documents adopted by the Council are posted, discussion of draft documents is being discussed and suggestions are made on the activities of the Center and the Council of the Central Bulletin Board. In September 2014, the Forest Biotechnology Center of the FGBU VNIILGISBIOTECH became a member of the Scientific and Technical Non-Profit Partnership "Technological Platform BioTech2030". An agreement on cooperation between FGBU VNIILGISBIOTECH and

FGBUN FIBH RAN was signed during the creation of an interdepartmental problem laboratory for forest biotechnology. An agreement on scientific and technical cooperation with the Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus for the period 2017 - 2020 has been signed. In addition to coordinating and organizational activities, the Center for Forest Biotechnologies within the framework of the state assignment for 2017-2019. Conducts fundamental and problem-oriented applied research work with promising forest species, aimed at solving the tasks stipulated in the action plan ("road map") "Development of Biotechnology and Genetic Engineering".

Prospects for the development of the Forest Biotechnology Center:

In the field of scientific research: Biotechnology: Preservation and reproduction of representatives of valuable gene pool of deciduous woody plants on the biotechnologies basis. Introduction of effective biotechnological development of FGBU "VNIILGISBIOTECH" into the practice of forestry, scientific support for the creation of plantations of fast-growing forest for purposes of the forest industry and bioenergy. Genetics and selection: Isolation of the original genetic material, the study of the inheritance of economically valuable traits and the creation of a permanent forest seed base of the main forest-forming and introduced tree species. Obtaining new genotypes of forest tree plants for replenishment of existing collections of valuable gene pool, and creation of new ones.

## ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОГРАММЫ В BIOTECHНОЛОГИИ

### EDUCATION PROGRAMS IN BIOTECHНОЛОLOGY

1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПУЩИНСКИМ НАУЧНЫМ ЦЕНТРОМ - КЛЮЧЕВОЙ ЭЛЕМЕНТ ПОДГОТОВКИ BIOTECHНОЛОГОВ В ТУЛЬСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ, Понаморева О.Н., Алферов В.А., Музафаров Е.Н., Решетилова Т.А., Боронин А.М. ....	779
INTERACTION WITH THE SCIENTISTS FROM PUSCHINO SCIENTIFIC CENTER IS A KEY ELEMENT OF TRAINING BIOTECHНОЛОГИSTS IN TULA STATE UNIVERSITY, Ponamoreva O.N., Alferov V.A., Muzafarov E.N., Reshetilova T.A., Boronin A.M. ....	780
2. ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ПОДГОТОВКИ СТУДЕНТОВ-BIOTECHНОЛОГОВ К НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ, Дворецкий Д.С., Дворецкая Е.В. ....	780
ON THE ORGANISATION OF RESEARCH TRAINING FOR BIOTECHНОЛОLOGY STUDENTS, Dvoretzky D. S., Dvoretzskaya E. V. ....	781
3. О ПОДГОТОВКЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА «СПЕЦИАЛИСТ В ОБЛАСТИ BIOTECHНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ», Корнеева О.С., Шуваева Г.П., Мещерякова О.Л., Свиридова Т.В., Мешкова М.А. ....	782
ON THE PREPARATION OF THE PROFESSIONAL STANDARD "SPECIALIST IN THE FIELD OF BIOTECHНОЛОLOGY OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES", Korneeva O.S., Shuvaeva G.P., Meshcheryakova O.L., Sviridova T.V., Meshkova M.A. ....	783
4. ОСОБЕННОСТИ ФЕДЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ФГОС 3++ ПО НАПРАВЛЕНИЯМ ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И BIOTECHНОЛОГИИ, Мезенова О.Я., Титова И.М., Агафонова С.В. ....	784
ON THE DEVELOPMENT OF FGOS 3++ ON EDUCATIONAL PROGRAMS FEDERAL TEACHING UNION 19.00.00 IN THE FIELD OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHНОЛОLOGY, Mezenova O.J., Titova I.M., Agafonova S.V. ....	785
5. ПЕРСПЕКТИВЫ ПОПУЛЯРИЗАЦИИ BIOTECHНОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В ШКОЛЕ В РОССИИ, Мальцевская Н.В., Караскова Н. ....	785
THE PROSPECTS OF PROMOTING BIOTECHНОЛОLOGY EDUCATION IN SCHOOLS IN RUSSIA, N. Maltsevskaya, N. Karásková ....	786
6. ПРИОРИТЕТНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ОБУЧЕНИЯ БАКАЛАВРОВ BIOTECHНОЛОГИИ В АГРАРНЫХ УНИВЕРСИТЕТАХ, Боровиков С.Н., Киян В. С., Муранец А.П. ....	787
PRIORITY DIRECTIONS OF THE TRAINING THE BACHELORS BIOTECHНОЛОLOGY AT THE AGRARIAN UNIVERSITY, S.N. Borovikov, V.S. Kiyán, A.P. Muranets ....	788
7. РАЗРАБОТКА BIOTECHНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ СОЧИНСКОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ В ПРОЦЕССЕ ПОДГОТОВКИ БАКАЛАВРОВ, ОБУЧАЮЩИХСЯ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ, Рыбалко А.А., Рыбалко А.Е. ....	789
DEVELOPMENT OF BIOTECHНОЛОLOGICAL METHODS FOR PRESERVATION OF BIODIVERSITY OF SOCHI BLACK SEA COAST IN THE PROCESS OF PREPARING BACHELORS, STUDYING IN THE BIOLOGICAL SCIENCES, Rybalko A.A., Rybalko A.E. ....	790
8. РОЛЬ ПРАКТИК В ПРОЦЕССЕ ПОДГОТОВКИ БАКАЛАВРОВ И МАГИСТРОВ, ОБУЧАЮЩИХСЯ В РАМКАХ УГС «ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И BIOTECHНОЛОГИЯ», М.Г. Сульман, Э.М. Сульман, Г.Н. Демиденко ....	790
ROLE OF PROFESSIONAL INTERNSHIP IN TRAINING OF BACHELORS AND MASTERS IN THE SPECIALTIES GROUP «INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIOTECHНОЛОLOGY», M.G. Sulman, E.M. Sulman, G.N. Demidenko ....	792
9. ТЕНДЕНЦИИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПО УГСН 19.00.00 ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И BIOTECHНОЛОГИИ В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ РАБОТОДАТЕЛЕЙ В ДВ РЕГИОНЕ, Каленик Т.К., Мезенова О.Я., Ищенко С.А., Косенко Т.А., Ли Н.Г., Разгонова М.П., Моткина Е.В. ....	793
TRENDS OF PERFECTION OF EDUCATIONAL PROGRAMS ON TOSHNIS 19.00.00 INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIOTECHНОЛОLOGY IN ACCORDANCE WITH THE REQUIREMENTS OF EMPLOYERS IN THE EAST REGION, Kalenik T.K., Mezenova O.J., Ishchenko S.A., Kosenko T.A., Lee N.G., Razgonova M.P., Motkina E.V. ....	793

10. ФОРМИРОВАНИЕ ПЕДАГОГИЧЕСКИХ КОМПЕТЕНЦИЙ ПРИ ПОДГОТОВКЕ МАГИСТРОВ-БИОТЕХНОЛОГОВ, Красноштанова А. А., Кузнецов А. Е. ....	794
FORMATION OF PEDAGOGICAL COMPETENCIES AT MASTERS-BIOTECHNOLOGIES TRAINING, Krasnoshtanova A.A., Kuznetsov A.Ye. ....	795

УДК 378+504.6

## **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПУЩИНСКИМ НАУЧНЫМ ЦЕНТРОМ – КЛЮЧЕВОЙ ЭЛЕМЕНТ ПОДГОТОВКИ БИОТЕХНОЛОГОВ В ТУЛЬСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ**

**Понаморева О.Н.<sup>1</sup>, Алферов В.А.<sup>1</sup>, Музафаров Е.Н.<sup>1</sup>, Решетилова Т.А.<sup>2</sup>, Боронин А.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия.  
300012, Тула, проспект Ленина, 92.

e-mail: olgaronamoreva@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина» РАН.  
142290, Пущино, Московская область, проспект Науки, 4.

Взаимодействие между университетами и институтами РАН является одним из самых эффективных путей повышения качества подготовки современных специалистов в наукоемких областях деятельности человека, таких как биотехнология.

**Ключевые слова:** высшее образование, подготовка научных и педагогических кадров, научно-образовательный центр, биотехнология

Результатом десятилетнего сотрудничества ТулГУ и институтов Пущинского научного центра РАН стало создание в 2005 году интегрированного междисциплинарного научно-образовательного центра (НОЦ) «Экобиотехнология», что позволило сформировать материально-техническую и научную базу, подготовить научно-педагогические кадры для реализации в ТулГУ нового биотехнологического направления обучения. С самого начала обучения биотехнологов были заложены высокие критерии подготовки современных специалистов. Эти критерии основывались на использовании знаний, опыта научных исследований ученых и экспериментальной базы ПНЦ РАН. Тесное взаимодействие научно-педагогического коллективов ТулГУ и ПНЦ РАН позволило создать систему, обеспечивающую повышение качества образовательного процесса путем вовлечения студентов, аспирантов, преподавателей университета в исследовательский процесс, формирование нового мировоззрения у молодых специалистов, направленного на практическую реализацию результатов фундаментальной науки, обеспечило гибкость и инновационный характер обучения в области биотехнологии, в том числе за счет вовлечения в образовательный процесс все новых и новых ученых из разных лабораторий и институтов РАН, работающих в области биотехнологии и смежных областях науки, реализации междисциплинарных курсов и осуществление научной деятельности в университете на академическом уровне. Взаимодействие в рамках НОЦ имеет разные формы: лекции ведущих ученых, практика студентов, выполнение выпускных квалификационных работ, магистерских диссертаций, некоторых исследований аспирантами и преподавателями ТулГУ в лабораториях институтов ПНЦ РАН и др. За годы деятельности НОЦ выполнено более 15 совместных научных проектов по Федеральным и ведомственным научным программам. Одним из важнейших результатов взаимодействия ТулГУ и ПНЦ РАН является подготовка кадров высшей квалификации, более 30 молодых кандидатов наук, прошедших «школу» НОЦ, работают в ТулГУ и ПНЦ РАН. Это позволило создать молодой, квалифицированный, энергичный научно-педагогический коллектив на кафедре биотехнологии и других кафедрах, которые участвуют в эффективной подготовке биотехнологов, химиков и биологов на междисциплинарном уровне.

UDC 378+504.6

## INTERACTION WITH THE SCIENTISTS FROM PUSCHINO SCIENTIFIC CENTER IS A KEY ELEMENT OF TRAINING BIOTECHNOLOGISTS IN TULA STATE UNIVERSITY

Ponamoreva O.N.<sup>1</sup>, Alferov V.A.<sup>1</sup>, Muzafarov E.N.<sup>1</sup>, Reshetilova T.A.<sup>2</sup>, Boronin A.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FSBEI HE «Tula State University», Tula, Russia.

300012, Tula, Lenin's Ave., 92.

e-mail: olgaponamoreva@mail.ru

<sup>2</sup> FSBSIS «Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms named after G.K. Skryabin» of RAS.

142290, Puschino, Moscow region, Science Ave., 4.

Interaction between universities and institutes of the Russian Academy of Sciences is one of the most effective ways to improve the quality of modern specialist training in high-technology, eg biotechnology

**Key words:** higher education, training of scientific and pedagogical staff, scientific and educational center, biotechnology

The result of 10-year cooperation between TSU and the Institutes of Puschino scientific center of RAS was the creation of integrated cross-disciplinary scientific and educational center (SEC) "Ecobiotechnology" in 2005 which, in its turn allowed building material, technical and scientific base, training scientific and teaching staff for the realization of new biotechnological sphere of education at TSU. From the very beginning of training biotechnologists the high criteria of training modern specialists were set. These criteria were based on using the knowledge and experience of scientific research, as well as the experimental facility of PSC RAS. The close cooperation of academics from TSU and PSC RAS enabled to create a system providing the increase of educational quality through involving the students, postgraduates and lecturers of the University into the research process, forming a new world view with the young specialists, aimed at practical application of the fundamental science results, provided the flexibility and innovative approach to training in biotechnology, including the commitment of still many scientists from different laboratories and institutes of RAS to the educational process. They work in biotechnology and the neighboring scientific spheres, realizing cross-disciplinary courses and doing academic scientific research. The interaction within SEC has different forms: lectures of the leading scientists, students' internship, doing final and qualification works, master's dissertations, doing some research by postgraduates and lecturers of TSU in the laboratories of PSC RAS institutes, etc. During many years of collaboration SEC has performed more than 15 mutual scientific projects on Federal and industry-sponsored scientific programs. One of the most important results of the interaction between TSU and PSC RAS is the training of high qualified personnel; more than 30 young PhDs "graduated" from SEC now are working for TSU and PSC RAS. This gave an opportunity to form young, highly qualified academic personnel, full of energy, for the chair of Biotechnology and other chairs taking part in the efficient training of biotechnologists, chemists and biologists on the cross-disciplinary level.

УДК 378.1

## ВОПРОСЫ ОРГАНИЗАЦИИ ПОДГОТОВКИ СТУДЕНТОВ-БИОТЕХНОЛОГОВ К НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Дворецкий Д.С., Дворецкая Е.В.

Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

392000, Тамбов, ул. Советская, д. 106

e-mail: dvoretsky@tambov.ru

Обсуждается создание программ поддержки научно-исследовательской деятельности студентов во взаимосвязи с научными проектами, реализуемыми в вузе, как инструмент повышения качества подготовки биотехнологов и вовлечения молодежи в науку.

**Ключевые слова:** подготовка специалиста; биотехнологическое образование; научно-исследовательская деятельность.

На сегодняшний день одной из наиболее актуальных задач, стоящих перед российскими вузами, является развитие научно-исследовательской и инновационной деятельности (НИД). Именно мероприятия научно-инно-

вационной направленности, результатом которых является воспроизводство и инкубирование инновационной продукции, способны обеспечить взаимосвязь вузов с реальным сектором экономики, интеграцию высшей школы с академическими и отраслевыми институтами. Реализация научных проектов повышает инвестиционную привлекательность вузов, а также потенциально способствует более высокому уровню готовности выпускников к научно-инновационной деятельности в их дальнейшей работе - при условии участия студентов в этих научных проектах.

Подготовка студентов к научно-исследовательской деятельности является обязательной составляющей модели выпускника университета. Формирование исследовательских навыков и умений у студентов вузов является одним из ключевых аспектов подготовки будущего специалиста. Готовность студента к НИД включает три компонента: 1) теоретические знания по предмету, 2) владение практическими навыками проведения лабораторных исследований – что особенно важно для такой практико-ориентированной области знаний как биотехнология, и 3) коммуникативные навыки – умения четко и грамотно представить результаты научного поиска в устной и письменной формах. Очевидно, что участие студентов, начиная с младших курсов, в научной деятельности способствует формированию на практике этих профессионально значимых навыков. Это особенно важно для первого уровня профессиональной подготовки – бакалавриата, так как значительно повышает качество и уровень выпускных работ студентов, а также ориентирует выпускников на продолжение научной работы в магистратуре и аспирантуре. Вовлечение студентов в научно-инновационную деятельность должно подразумевать их участие в научных исследованиях, проводящихся в университете, участие в конкурсах инновационных и бизнес-проектов, сотрудничество со студенческими конструкторскими бюро и малыми инновационными предприятиями, проведение опытно-конструкторских работ в инжиниринговых центрах. К примеру, участие в проведении экспериментов ведет к освоению методики планирования эксперимента, составление экспериментальных отчетов готовит студентов к написанию научных работ в будущем (статьи, дипломная работа, диссертация) и т.д. Результаты научных исследований отражаются в выпускных работах бакалавров, магистерских и кандидатских диссертациях.

Вместе с тем, на практике часто наблюдается следующая ситуация: учебные планы подготовки бакалавров-биотехнологов перенасыщены общетеоретическими курсами, которые, безусловно, необходимы, однако могут не отражать специфики научных исследований, проводимых в конкретном вузе. Остро ощущается нехватка реального времени, необходимого для овладения лабораторными навыками и методикой научного эксперимента. Коммуникативный компонент НИД, в частности составление актуальных литературных обзоров, часто и вовсе не выделяется, оставаясь, таким образом, «на совести» руководителей практик, курсовых проектов, дипломных работ и др.

Выходом из этой ситуации могло бы стать создание дополнительных программ поддержки студенческих научных исследований на кафедрах и в вузах в целом и вовлечение наиболее талантливых студентов в исследования в рамках грантов. Обязательным элементом подготовки таких студентов должно стать участие в программах для молодых учёных, стремящихся самореализоваться через инновационную деятельность, таких как «УМ.Н.И.К.», «УМНИК на СТАРТ». Данные программы напрямую стимулируют массовое участие молодежи в научно-технической и инновационной деятельности, готовят молодых ученых к коммерциализации «научекомких» направлений бизнеса.

Организация такого дополнительного обучения для студентов-исследователей имеет целый ряд преимуществ: способствует индивидуализации образовательного пути студента, готовит студентов к обучению в магистратуре и аспирантуре, стимулирует создание стартапов среди молодежи.

UDK 378.1

## ON THE ORGANISATION OF RESEARCH TRAINING FOR BIOTECHNOLOGY STUDENTS

*Dvoretzky D. S., Dvoretzskaya E. V.  
Tambov State Technical University, Tambov, Russia  
ul. Sovetskaya, 106 Tambov 392000  
e-mail: dvoretzsky@tambov.ru*

The paper discusses the creation of programs to support the students' research activities in the correlation with scientific projects implemented in the university, as a tool to improve the quality of training of biotechnologists and the involvement of young people in research.

**Key words:** professional training; biotechnology education; research activities.



To date, one of the most pressing tasks facing Russian universities is fostering research and development (R&D) and innovation activities. It is these activities, aimed at the reproduction and incubation of innovative products, that can ensure the interrelation of universities with the real sector of the economy, the integration of higher education with academic and industry institutions. The implementation of research projects increases the investment attractiveness of universities, and also potentially contributes to a higher level of graduates' preparedness for research and innovative activities in their future work, provided that students participate in these research projects.

The preparation of students for research activities is an obligatory component of a university graduate's model. Formation of research skills and abilities among university students is one of the key aspects of training a future specialist. Student's preparedness for R&D activities includes three components: 1) theoretical knowledge of the subject, 2) possession of practical skills in conducting laboratory research - which is especially important for such a practice-oriented area of knowledge as biotechnology, and 3) communication skills - the ability to clearly and competently present the results of scientific search in oral and written forms.

It is obvious that the participation of students, starting with junior years, in research activities contributes to the formation of these professionally significant skills in practice. This is especially important for the first level of professional training - bachelor's degree, since it significantly improves the quality and level of graduate work of students, and also directs graduates to continue their scientific work in master and doctorate programmes. Students' participation in research and innovative activities should involve their taking part in scientific research conducted at the university, participation in competitions of innovative and business projects, cooperation with student design offices and small innovative enterprises, conducting development work in engineering centers. For example, participation in experiments leads to the mastery of the methodology for planning the experiment, the preparation of experimental reports prepares students for writing scientific papers in the future (abstracts, articles, theses), etc. The results of scientific research are reflected in the graduate work of bachelors, master's and PhD dissertations.

At the same time, in practice, the following situation is often observed: the curricula of biotechnology undergraduate programmes are oversaturated with general theoretical courses, which, of course, are necessary, but may not reflect the specifics of scientific research conducted in a particular institution. There is an acute shortage of real time necessary for mastering laboratory skills and the methodology of a scientific experiment. The communicative component of R&D, in particular the compilation of actual literature reviews, often does not stand out at all, thus remaining 'the responsibility' of advisors of course projects, theses, etc.

The way out from this situation could be the creation of further programmes to support student research in the departments and universities and involving the most talented students in research in the framework of research grants. An obligatory element in the preparation of such students should be participation in programmes for young scientists striving for self-fulfillment through innovative activities, such as "UMNIK", "UMNIK na START". These programmes directly stimulate massive participation of young people in R&D and innovative activities, prepare young scientists for the commercialization of "research-intensive" areas of business.

The organization of such supplementary training for student researchers has a number of advantages: it helps to individualize the student's educational path, prepares students for master and doctorate studies, and stimulates the creation of start-ups among young people.

УДК 378.4

## **О ПОДГОТОВКЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО СТАНДАРТА «СПЕЦИАЛИСТ В ОБЛАСТИ BIOTEХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ»**

**Корнеева О.С., Шуваева Г.П., Мещерякова О.Л., Свиридова Т.В., Мешкова М.А.**

*Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия  
 394036, проспект Революции, д. 19  
 e-mail: korneeva-olgas@yandex.ru*

Проект профессионального стандарта «Специалист в области биотехнологии биологически активных веществ» включает вид профессиональной деятельности, описание трудовых функций, включая трудовые действия, необходимые умения и необходимые знания для осуществления той или иной функции в соответствии с уровнем квалификации, и характеристику обобщенных трудовых функций.

**Ключевые слова:** профессиональный стандарт; биологически активные вещества; трудовые функции; биотехнологии

В настоящее время проблемы подбора и подготовки персонала приобретают все большую актуальность.

Быстрый темп развития технологий значительно опережает систему требований производства к составу рабочих профессий, их компетенциям, не обеспечивая своевременную трансляцию в систему образования. Таким образом, возникает необходимость создания и внедрения более эффективных и надежных способов регулирования отношений между сферами труда и образования. Одним из таких способов является применение профессиональных стандартов, включающих характеристику квалификации, необходимой работнику для осуществления определенного вида профессиональной деятельности, при разработке федеральных государственных образовательных стандартов профессионального образования (ФГОС).

Существующие профессиональные стандарты в области биотехнологий: специалист-технолог в области природоохранных (экологических) биотехнологий; специалист по контролю качества биотехнологического производства препаратов для растениеводства; специалист в области разработки, сопровождения и интеграции технологических процессов и производств в области биотехнических систем и технологий не в полной мере отвечают требованиям формирования компетентностной модели выпускника - биотехнолога в области получения биологически активных веществ. Учитывая, что разработка профессиональных стандартов может осуществляться организациями профессионального образования, Воронежский государственный университет инженерных технологий (ВГУИТ) составил реестр профессиональных стандартов, планируемых к разработке для направлений подготовки, включая бакалавра и магистра по направлению подготовки биотехнология.

Проект профессионального стандарта «Специалист в области биотехнологии биологически активных веществ» включает вид профессиональной деятельности - разработку и ведение биотехнологических процессов получения биологически-активных веществ (БАВ). Далее приводится описание трудовых функций, входящих в профессиональный стандарт (функциональная карта вида профессиональной деятельности) и характеристика обобщенных трудовых функций. Трудовые функции включают: подготовку питательных сред, посевного материала, оборудования для осуществления биотехнологического процесса получения БАВ; организацию и проведение контроля качества сырья, промежуточных продуктов и готовой продукции в соответствии с регламентом; организацию и управление участком по производству БАВ; разработку и внедрение системы управления качеством и безопасностью продуктов биотехнологии; оптимизацию и управление выпускаемой продукцией биотехнологии; разработку новых и модернизацию существующих биотехнологических процессов получения БАВ; апробацию и внедрение наилучших решений по оптимизации биотехнологий БАВ. Каждая трудовая функция содержит описание трудовых действий, необходимых умений и необходимых знаний для осуществления той или иной функции в соответствии с уровнем квалификации.

Обобщенные трудовые функции включают: осуществление биотехнологической деятельности по получению БАВ; организацию и управление действующими биотехнологическими процессами и производством; совершенствование биотехнологий БАВ с использованием микробиологического синтеза и биотрансформации микроорганизмов, клеточных культур животных и растений.

Обсуждение проекта профессионального стандарта было проведено на официальном портале разработчика – Ассоциации «ТППП АПК» <http://платформа-апк.рф> в разделе «форум – обсуждение профессиональных стандартов», а также на круглом столе в рамках форума «РосБиоТех – 2016» (г. Москва).

UDC 378.4

## ON THE PREPARATION OF THE PROFESSIONAL STANDARD “SPECIALIST IN THE FIELD OF BIOTECHNOLOGY OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES”

Korneeva O.S., Shuvaeva G.P., Meshcheryakova O.L., Sviridova T.V., Meshkova M.A.

Voronezh state university of engineering technologies, Voronezh, Russia, 394036, Revolyutsii av., 19  
e-mail: korneeva-olgas@yandex.ru

The draft professional standard “Specialist in the field of biotechnology of biologically active substances” includes the type of professional activity, the description of labor functions (including labor, the necessary skills and necessary knowledge to perform a function in accordance with the level of qualification), and a description of the generalized labor functions.

**Key words:** professional standard; biologically active substances; labor functions; biotechnology

At present, the problems of recruiting and training personnel are becoming increasingly important. The rapid pace of technological development is much faster than the system of production requirements to the composition of the working professions, their competencies, not providing timely transmission to the education system. Thus, there is a need to create and implement more effective and reliable ways to regulate the relationship between the spheres of

work and education. One of such methods is the application of professional standards, including the qualification required for an employee to carry out a certain type of professional activity, while developing federal state educational standards for vocational education (FSES).

Existing professional standards in the field of biotechnology: a specialist in the field of environmental (ecological) biotechnologies; a specialist in quality control of biotechnological production of preparations for plant growing; specialist in the development, support and integration of technological processes and industries in the field of biotechnical systems and technologies do not fully meet the requirements of forming a competence model of a graduate - biotechnologist in the field of obtaining biologically active substances. The development of professional standards can be carried out by professional education organizations, therefore Voronezh State University of Engineering Technologies (VSUET) has compiled a register of professional standards planned for development for training areas, including bachelor and master in biotechnology training.

The draft professional standard "Specialist in Biotechnology of Biologically Active Substances" includes a kind of professional activity - development and maintenance of biotechnological processes for the production of biologically active substances (BAS). The following is a description of the labor functions included in the professional standard (functional map of the type of professional activity) and the characteristics of generalized labor functions. Labor functions include: preparation of nutrient media, seed, equipment for the implementation of biotechnological process for the production of BAS; organization and conduct of quality control of raw materials, intermediate products and finished products in accordance with the regulations; organization and management of the site for the production of BAS; development and implementation of a system for managing the quality and safety of biotechnology products; optimization and management of biotechnology products; the development of new and modernization of existing biotechnological processes for the production of BAS; approbation and implementation of the best solutions for the optimization of biotechnologies BAS. Each labor function contains a description of labor, necessary skills and the necessary knowledge to perform a function in accordance with the level of qualifications.

Generalized labor functions include: implementation of biotechnological activities for obtaining BAS; organization and management of existing biotechnological processes and production; improvement of biotechnology BAS with the use of microbiological synthesis and biotransformation of microorganisms, cell cultures of animals and plants.

Discussion of the draft professional standard was held on the official portal of the developer - Association "TPPP APK" <http://platform-ap.kr> in the section "forum - discussion of professional standards", as well as at the round table within the framework of the forum "RosBioTech - 2016" (Moscow).

УДК 663.1

## ОСОБЕННОСТИ ФЕДЕРАЛЬНЫХ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ФГОС 3++ ПО НАПРАВЛЕНИЯМ ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И BIOTEХНОЛОГИИ

**Мезенова О.Я., Титова И.М., Агафонова С.В..**

*ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», Калининград, Россия,  
 236022, Калининград, Советский проспект, 1  
 e-mail: mezenova@klgtu.ru*

Рассмотрены Федеральные государственные образовательные стандарты третьего поколения (ФГОС 3++) по направлениям бакалавриата и магистратуры в области пищевых технологий и биотехнологии в рамках ФУМО 19.00.00.

**Ключевые слова:** ФУМО, ФГОС, образовательные программы

В 2017 в ФУМО 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнологии» одной из основных задач являлась актуализация Федеральных государственных образовательных стандартов (ФГОС 3++). Отделение пищевых технологий и биотехнологии актуализировало 9 видов ФГОС 3++ по направлениям: 19.03.01 и 19.04.01 «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», 19.03.05 и 19.04.05 «Высокотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения». Особенностью ФГОС является ориентация на профессиональные функции, профессиональные стандарты, рынки труда и международный опыт. В ФГОС прописаны области профессиональной деятельности, входящие в Реестр профессиональных стандартов, в которых выпускники могут осуществлять профессиональную деятельность. Основные области:

01- Образование, 02 – Здравоохранение, 13 - Сельское хозяйство, 15 -Рыбоводство и рыболовство, 22 - Пищевая промышленность, 26 - Химическое, химико-технологическое производство, 33 – Сервис, общественное питание; 40 - Сквозные виды профессиональной деятельности в промышленности. Стандарты допускают, что выпускники могут работать и в других областях при условии соответствия уровня образования и полученных компетенций требованиям к квалификации работника.

UDK 663.1

## **ON THE DEVELOPMENT OF FGOS 3++ ON EDUCATIONAL PROGRAMS FEDERAL TEACHING UNION 19.00.00 IN THE FIELD OF FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY**

**Mezenova O.J., Titova I.M., Agafonova S.V.**

*Kaliningrad State Technical University”, Kaliningrad, Russia,  
236022, Kaliningrad, Soviet Avenue 1  
e-mail: mezenova@klgtu.ru*

The draft of the Federal State Educational Standards (FSEP), the third generation (3 ++) in areas of training undergraduate and graduate programs in the field of Food Technology and Biotechnology have been considered (FUMO 19.00.00)

**Key words:** FUMO, FSEP, educational programs

In 2017 in FUMO 19.00.00 “Industrial ecology and biotechnology” one of the main tasks was to develop a new generation of FSEP. Department of Food Technology and Biotechnology of the FUMO has developed 9 FSEP projects 3 ++ in directions: 19.03.01 and 19.04.01 “Biotechnology”, 19.03.02 and 19.04.02 “Food from plants”, 19.03.03 and 19.04.03 “Products of animal origin”, 19.03.04 and 19.04.04 “Technology of production and catering “19.04.05” The high-tech production of functional and special purpose foods”. These refer FSEP to the third generation of educational standards, their difference being the focus on professional standards which determine the interaction of the labor market and the education system. The FSEP prescribed area of professional activity included in the register of professional standards in which graduates can carry out professional activities. Main areas: 01 - Education, 02 - Health 13 - Agriculture, 15 - Fisheries and fish breeding, 22 - Food industry 26 - Chemical, chemical-technological production, 33 - Service, catering; 40 - Through professional activities in the industry Graduates can work in other areas, provided the level of education and competency requirements for the qualification of the worker is met.

УДК 573.6.086, 37.033, 37.031.4

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ПОПУЛЯРИЗАЦИИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ В ШКОЛЕ В РОССИИ**

**Мальцевская Н.В. <sup>1</sup>, Караскова Н. <sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение города Москвы «Воробьевы горы» (ГБПОУ «Воробьевы горы») Москва, Россия, maltsevskaya@yandex.ru

<sup>2</sup> Факультет Естественных наук, Университет Градец Кралове (УНК), Градец Кралове, Чешская Республика, natalie.karaskova@uhk.cz

Работа посвящена проблеме популяризации биотехнологии в средней школе.

**Ключевые слова:** биотехнология в школе, популяризация науки в школе

В настоящее время биотехнология и связанные с ней направления науки, такие как биохимия, биофизика, бионика, биокибернетика, биоинформатика и др. не находят должного отражения в рамках школьного образования. Проблема популяризации крайне актуальна в условиях настоящего времени, так как будущие абитуриенты не имеют полноценного выбора будущей профессии из-за нехватки информации. Также следует отметить нехватку понимания у обучающихся взаимосвязи дисциплин, преподаваемых в школе. ВУЗы теряют большое число потенциальных студентов, которые могли бы показать высокие результаты в области биотехнологии.

Существенной проблемой широкого круга обучающихся средней школы является отсутствие информации об этих быстроразвивающихся направлениях науки.

Таким образом, важно отметить необходимость популяризации данных научных направлений в рамках школьного образования.

В сетке часов урочного времени достаточно сложно реализовывать данный аспект. Однако, в рамках дополнительного образования это осуществимо.

Среди множества возможных вариантов решения данной проблемы можно выделить следующие:

- Проведение научно-популярных лекториев с участием ведущих специалистов в данной научной области, с возможностью участия в лектории не только обучающихся, но и их родителей.

- Осуществление программ дополнительного образования, посвященных знакомству с основами биотехнологии и связанных с ней научными направлениями.

- Проведение проектно-исследовательских работ в области биотехнологии, которые дадут возможность познакомиться обучающимся с интересными и перспективными направлениями в науке на практике.

Литература:

1. DOLEZAL, Rafael, Jiri KRENEK, Veronika RACAKOVA, et al. ANN and GMDH Algorithms in QSAR Analyses of Reactivation Potency for Acetylcholinesterase Inhibited by VX Warfare Agent. NGUYEN, Ngoc Thanh, George A. PAPADOPOULOS, Piotr JEĐRZEJOWICZ, Bogdan TRAWIŃSKI a Gottfried VOSSSEN, ed. Computational Collective Intelligence [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 171-181 [cit. 2017-12-18]. Lecture Notes in Computer Science. DOI: 10.1007/978-3-319-67077-5\_17. ISBN 978-3-319-67076-8.
2. KARÁSKOVÁ, N., MALCEVSKAJA, N. V., MYŠKA, K., KOLÁŘ. K.: Molekulární modely přírodních látek obsahujících konjugované systémy dvojných vazeb. *Biologie – Chemie – Zeměpis*. 2016, roč. 25, č.4, s. 229-231
3. Мальцевская Н.В. Школьный инженерно-исследовательский проект в области биотехнологии в сборнике докладов «Управление качеством инженерного образования. Возможности ВУЗов и потребности промышленности»: Тезисы докладов второй международной научно-практической конференции: Москва, 23-25 июня 2016 г. / Отв. ред. Е.В. Смирнова. – М.: Изд-во НУК ИУ МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2016. – 284-226 с.

UDC 573.6.086, 37.033, 37.031.4

## THE PROSPECTS OF PROMOTING BIOTECHNOLOGY EDUCATION IN SCHOOLS IN RUSSIA

N. Maltsevskaya <sup>1</sup>, N. Karásková <sup>2</sup>

<sup>1</sup> State budget professional educational institution of Moscow city "Vorobyovy Gory" (Vorobyovy Gory) Moscow, Russia, maltsevskaya@yandex.ru

<sup>2</sup> Faculty of science, University of Hradec Králové (UHK), Hradec Králové, Czech Republic

The work is devoted to the problem of popularization of biotechnology in secondary school.

**Key words:** biotechnology in school, promoting science at school

Currently, biotechnology and closely related areas of science such as biochemistry, Biophysics, bionics, biocybernetics, bioinformatics etc. are not sufficiently reflected in the school of education. The problem of promoting highly relevant in the present time, as future applicants do not have a full career due to lack of information. Also we have the lack of understanding among students of the connection of school subjects. Universities lose a large number of potential students who could show good results in the field of biotechnology.

A significant problem of a wide range of school pupils is the lack of information on these emerging areas of science.

Thus, it is important to note the need to promote these research directions within the school of education.

During the week the appointed time is quite difficult to implement this aspect. However, in the framework of additional education possible.

Among the many possible solutions to this problem are the following:

- Scientific-popular lectures with participation of specialists in this scientific field, with the opportunity to participate in lectures not only schoolstudents, but also their parents.

- Implementation of programs of additional education on getting acquaintance with the basics of biotechnology and related scientific areas.

- Conducting research and development in biotechnology, which will give the opportunity to meet students with

interesting and promising areas in science in practice.

References:

1. DOLEZAL, Rafael, Jiri KRENEK, Veronika RACAKOVA, et al. ANN and GMDH Algorithms in QSAR Analyses of Reactivation Potency for Acetylcholinesterase Inhibited by VX Warfare Agent. NGUYEN, Ngoc Thanh, George A. PAPADOPOULOS, Piotr JEDRZEJOWICZ, Bogdan TRAWIŃSKI a Gottfried VOSSEN, ed. *Computational Collective Intelligence [online]*. Cham: Springer International Publishing, 2017, s. 171-181 [cit. 2017-12-18]. *Lecture Notes in Computer Science*. DOI: 10.1007/978-3-319-67077-5\_17. ISBN 978-3-319-67076-8.
2. KARÁSKOVÁ, N., MALCEVSKAJA, N. V., MYŠKA, K., KOLÁŘ. K.: Molekulární modely přírodních látek obsahujících konjugované systémy dvojných vazeb. *Biologie – Chemie – Zeměpis*. 2016, roč. 25, č.4, s. 229-231
3. Мальцевская Н.В. Школьный инженерно-исследовательский проект в области биотехнологии в сборнике докладов «Управление качеством инженерного образования. Возможности ВУЗов и потребности промышленности»: Тезисы докладов второй международной научно-практической конференции: Москва, 23-25 июня 2016 г. / Отв. ред. Е.В. Смирнова. – М.: Изд-во НУК ИУ МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2016. – 284-226 с.

УДК 378.147

## ПРИОРИТЕТНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ОБУЧЕНИЯ БАКАЛАВРОВ БИОТЕХНОЛОГИИ В АГРАРНЫХ УНИВЕРСИТЕТАХ

**Боровиков С.Н., Киян В. С., Муранец А.П.**

Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, Астана, Казахстан  
010000 Астана, пр.Победы, д.62  
e-mail: nicsb\_katu@mail.ru

Изложены основные приоритетные направления обучения в бакалавриате по специальности биотехнологии в аграрных вузах.

**Ключевые слова:** бакалавр, методы обучения, биотехнология

Биотехнология является одним из наиболее важных направлений технологического развития в целом ряде отраслей мировой экономики. Вне зависимости от уровня развития собственных биотехнологий, в условиях глобализации Республика Казахстан (РК) будет втянута в потребление продукции мировой биоиндустрии [1]. В связи с этим, государству нужны квалифицированные кадры в этой отрасли народного хозяйства.

В Казахском агротехническом университете им. С. Сейфуллина (ранее Целиноградский сельскохозяйственный институт) в 1987 году был создан первый в республике Биотехнологический центр, который стал базой проведения научных исследований и подготовки специалистов биотехнологического профиля для сельского хозяйства. Основной целью обучения будущих специалистов - биотехнологов является формирование основных профессиональных компетенций по направлению ветеринарная биотехнология, биотехнология растений и фармацевтическая биотехнология. Изучение базовых биологических дисциплин (ботаники, зоологии, микробиологии) на младших курсах направлены не только на накопление знаний, но и закладку фундамента для проведения будущих научных исследований. В этих целях используются инновационные методы преподавания (метод проектов, кейс-технологии и др.). Обучение студентов на старших курсах сочетает в разумном соотношении работу в аудиториях и участие в научно-исследовательской работе под руководством ведущих ученых университета, а также приглашенных отечественных и зарубежных исследователей. При выполнении научных исследований в рамках грантов, выделяемых Министерством науки и образования РК, каждый руководитель в обязательном порядке включает в состав исполнителей магистрантов и студентов. Участие в выполнении исследований по грантам и получение заработной платы является дополнительным стимулом привлечения молодых исследователей в научную сферу. Наиболее успешно развиваются такие научные направления как клеточная биотехнология и молекулярно-генетические исследования. При непосредственном участии студентов получены штаммы гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела (МКА) к возбудителям болезней сельскохозяйственных животных и вирусам картофеля. Штаммы защищены патентами РК, соавторами которых являются и студенты, принимавшие участие в исследованиях. На основе МКА созданы диагностические тест-системы нового поколения и разработана документация по их применению. Большую роль в обучении биотехнологов в университете имеют учебные и производственные практики. Под руководством опытных специалистов, студенты закрепляют теоретические знания и получают практические навыки, необходимые для работы на производстве. Базами прохождения практик являются 15 организаций, вклю-

чая РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», РГП «Национальный центр биотехнологии» и другие. В связи с повышением требований к выпускникам-биотехнологам, в университете принята программа по развитию цифровых технологий, информационному моделированию, генетической инженерии, особое внимание при этом уделено этическим аспектам развития исследований. Необходимо создать условия обучения студентов методикам быстрого поиска релевантной информации и систематизации знаний в эпоху информационного взрыва [2].

Таким образом, выполнение вышеперечисленных условий, а также развитие известной триады «инвестиции – кадры – производство» позволит создать современную технологию подготовки специалистов - биотехнологов.

*Литература:*

1. Акимбаева А.М., Сартбаев М.М. Состояние и перспективы развития биотехнологии// Вклад молодых исследователей в индустриально-инновационное развитие Казахстана: тезисы док. конференции. – Усть – Каменогорск, 2009. - С.14-16
2. Муранец А.П., Боровиков С.Н. Проблемы преподавания в ВУЗе биологических дисциплин в век «информационного взрыва»: сб.ст. XII межд. конф., Санкт-Петербург, 2017. – С. 34-37

UDS 378.147

## **PRIORITY DIRECTIONS OF THE TRAINING THE BACHELORS BIOTECHNOLOGY AT THE AGRARIAN UNIVERSITY**

**S.N. Borovikov, V.S. Kiyani, A.P. Muranets**

*Saken Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Astana, Kazakhstan  
 010000 Astana, Zhenis avenue, 62  
 e-mail: nicsb\_katu@mail.ru*

The main priority directions of the training in the bachelor's degree on the specialty of biotechnology in agrarian universities are outlined.

**Key words:** bachelor, teaching methods, biotechnology

Biotechnology is one of the most important areas of technological development in a number of industries of the world economy. Regardless of the level of development of their own biotechnologies, in the context of globalization, the Republic of Kazakhstan (RK) will be drawn into consumption of the world bio-industry products [1]. In this regard, the state needs qualified staff in this sector of the national economy.

The first in the Republic of Biotechnology Center was created in 1987 at the S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University (formerly the Tselenograd Agricultural Institute) and it became the base of research and training for biotechnological specialists for agriculture. The main goal of training future specialists - biotechnologists is to form the main professional competencies in the direction of veterinary biotechnology, plant biotechnology and pharmaceutical biotechnology. The study of basic biological disciplines (botany, zoology, microbiology) in junior courses is aimed not only at the accumulation of knowledge, but also laying the foundation for future scientific research. For this purpose innovative methods of teaching (project method, case studies, etc.) are used. Training of students in senior courses combines in a reasonable proportion of work in the classrooms and participation in research work under the leadership of leading scientists of the university, as well as invited domestic and foreign researchers. When carrying out scientific research within the framework of the grants allocated by the Ministry of Science and Education of the RK, each project manager necessarily includes undergraduates and master students in the composition of performers. Participation in the implementation of research on grants and the receipt of wages is an additional stimulus for attracting young researchers to the scientific sphere. The most successfully developing are scientific directions such as cellular biotechnology and molecular genetic studies. With the direct participation of students, strains of hybrid cells producing monoclonal antibodies (Mab) to pathogens of agricultural diseases and potato viruses were obtained. The strains are protected by patents of the RK, co-authors of which are also students who took part in the research. On the basis of Mab, diagnostic test-systems of a new generation have been created and documentation on their application has been developed. Educational and production practices play an important role in the training of biotechnologists at the university. Under the guidance of experienced specialists, students consolidate theoretical knowledge and acquire practical skills that are necessary for working in production. Bases of practice are 15 organizations, including RSE "Republican Collection of Microorganisms", RSE "National Center of Biotechnology" and others. In connection with the increase in requirements for graduates-biotechnologists,

in the university adopted a program on the development of digital technologies, information modeling, genetic engineering, with particular attention to the ethical aspects of research development. It is necessary to create conditions for students' learning methods quick search of relevant information and systematization of knowledge in the era of information explosion [2].

Thus, implementation of the above conditions, as well as the development of the well-known triad "investment - personnel - production" will create a modern technology for training specialists - biotechnologists.

*References:*

1. Akimbaeva A.M., Sartbaev M.M. Status and prospects of development of biotechnology // Contribution of young researchers to the industrial-innovative development of the Kazakhstan: abstracts of conference reports. – Ust-Kamenogorsk, 2009. – P.14-16.
2. Muranets A.P., Borovikov S.N. Problems of teaching in the university of biological disciplines in the age of the "information explosion": collection of articles of the XII Intern. Conf., St. Petersburg, 2017. – P. 34-37.

УДК 57.086.83:502.75

## **РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ БИОРАЗНООБРАЗИЯ СОЧИНСКОГО ПРИЧЕРНОМОРЬЯ В ПРОЦЕССЕ ПОДГОТОВКИ БАКАЛАВРОВ, ОБУЧАЮЩИХСЯ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ**

**Рыбалко А.А., Рыбалко А.Е.**

Сочинский институт Российского университета дружбы народов, 354340, г. Сочи, ул. Куйбышева, 32,  
E-mail :sfrudn@rambler.ru, факс: +7 (8622)411043. Сочи, Россия.

Аннотация. В процессе обучения бакалавров по направлениям биология, экология и природопользование, ветеринарно-санитарная экспертиза и специалистов по направлению ветеринария в качестве биологических материалов используются растения, широко представленные в пригородных лесах города Сочи.

**Ключевые слова:** биоразнообразии, клеточная инженерия, экологоориентированное правосознание.

Перспективы использования методов культуры *in vitro* в решении проблем сохранения видового состава флоры региона должны иметь решающее значение для сохранения биоразнообразия и успешного применения природной флоры в народном хозяйстве. В процессе выполнения лабораторных и дипломных (выпускных квалификационных) работ используются новейшие методы клеточной инженерии. Активная работа студентов под руководством преподавателей кафедры физиологии позволяет им успешно представлять результаты этих исследований на конференциях с последующей публикацией, в том числе, и в зарубежных периодических изданиях.

Студенческие дипломные (выпускные квалификационные) работы, выполняемые в течение многих лет на кафедре физиологии посвященные характеристике природной экологической обстановки в местах прохождения производственных практик, имея прямое отношение к оценке экологического состояния региона, могут найти конкретное применение в решении экологических задач.

Природная флора Кавказа представлена растениями, большинство из которых являются уникальными во многих отношениях. Природные ландшафты Сочинского Причерноморья отличаются древностью своего происхождения, богатством и высоким биологическим разнообразием растительного и животного мира. Только высших сосудистых растений во флоре региона насчитывается более 2 тысяч видов с большим числом (более 20%) эндемичных и реликтовых видов [2]. Делается правовое обоснование внедрения флоры в народное хозяйство что предполагает выработку экологоориентированное правосознание [1].

*Литература:*

1. Рыбалко А.Е., Оганесян. А.К. Экологоориентированное правосознание как одна из ключевых задач юридического образования в целях содействия сохранению биоразнообразия. IX международный конгресс: «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва 20-22 февраля 2017, с. 540-550.
2. Солодько А.С. К геоботаническому районированию Сочинского Причерноморья/А.С. Солодько // Бот. Журн. - 1999. -Т.84,- №1.- 45- 56.
3. Солодько А.С. К охране приморских рекреационных ландшафтов Сочинского Причерноморья /А.С. Солодько // Доклады Сочинского отделения Русского географического общества, - в. 4.- Сочи, 2007,45-52



UDC 57.086.83:502.75

## DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR PRESERVATION OF BIODIVERSITY OF SOCHI BLACK SEA COAST IN THE PROCESS OF PREPARING BACHELORS, STUDYING IN THE BIOLOGICAL SCIENCES

Rybalko A.A., Rybalko A.E

Sochi Institute of the Russian People's Friendship University, 354340, Sochi, ul. Kuibyshev, 32, E-mail: sfrudn@rambler.ru, fax: +7 (8622) 411043. Sochi, Russia.

Annotation. In the process of training bachelors in the areas of biology, ecology and nature management, veterinary and sanitary examination and specialists in the veterinary medicine as biological materials are used plants, widely represented in the suburban forests of Sochi.

Prospects of using in vitro culture methods in solving the problems of preserving the species composition of the flora of the region should have decisive importance for the conservation of biodiversity and the successful use of natural flora in the national economy. In the process of performing laboratory and graduate (final qualifying) works the latest methods of cellular engineering are used. Active work of students under the guidance of teachers of the Department of Physiology allows them to present successfully the results of these studies at conferences with subsequent publication, including in foreign periodicals.

Student graduate work (final qualifying), performed for many years at the Department of Physiology, dedicated to characterizing the environmental situation in the field of production practices, directly related to the assessment of the ecological state of the region, can find concrete application in solving environmental problems.

The natural flora of the Caucasus is represented by plants, most of which are unique in many respects. The natural landscapes of the Sochi Black Sea Coast are distinguished by the antiquity of their origin, richness and high biological variety of flora and fauna. Only higher vascular plants in the flora of the region number more than 2 thousand species with a large number (more than 20%) of endemic and relic species [2]. A legal justification for the introduction of flora into the national economy is being made, which involves the development of an environmentally-oriented sense of justice [1].

### References:

1. Rybalko A.E, Oganessian. A.K. Ecological sense of justice as one of the key tasks of legal education in order to promote the conservation of biodiversity. IX International Congress: "Biotechnology: state and development prospects". Moscow, February 20-22, 2017, p. 540-550.
2. Solodko A.S. To geobotanical zoning of the Sochi Black Sea coast / A.S. Solodko // Bot. Jour. - 1999.-T.84, - No. 1.- 45-56.
3. Solodko A.S. To the protection of the coastal recreational landscapes of the Sochi Black Sea Coast / A.S. Solodko // Reports of the Sochi branch of the Russian Geographical Society, - in. 4.- Sochi, 2007,45-52

УДК 378.14

## РОЛЬ ПРАКТИК В ПРОЦЕССЕ ПОДГОТОВКИ БАКАЛАВРОВ И МАГИСТРОВ, ОБУЧАЮЩИХСЯ В РАМКАХ УГС «ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И BIOTEХНОЛОГИЯ»

М.Г. Сульман, Э.М. Сульман, Г.Н. Демиденко

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия  
170026, Россия, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22  
e-mail: sulman@online.tver.ru

Для формирования у обучающихся способности самостоятельно мыслить, приобретать и применять знания, тщательно обдумывать принимаемые решения и чётко планировать действия в сфере профессиональной деятельности необходима практика, как один из важнейших элементов образовательного процесса и основа выпускной квалификационной работы.

**Ключевые слова:** практика, биотехнология, высшее образование.

В основе образовательной политики России лежит необходимость обеспечения высокого качества образования с одновременным сохранением его фундаментальности и соответствия современным потреб-

ностям личности, общества и государства. Выпускники вузов должны быть способны самостоятельно мыслить, добывать и применять знания, тщательно обдумывать принимаемые решения и четко планировать действия, ориентированы на работу с технологиями завтрашнего дня, поэтому подготовка не может осуществляться без вовлечения обучающихся в передовые исследования, без практики личного участия студентов в работе предприятий и организаций всех отраслей экономики страны.

Концепция образовательной программы подготовки студентов, обучающихся по направлениям подготовки укрупненной группы специальностей (УГС) 190000 «Промышленная экология и биотехнология», таких как «Биотехнология», «Продукты питания из растительного сырья», «Продукты питания животного происхождения», «Технология продукции и организация общественного питания» и «Высокотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения», предусматривает, подготовку выпускников к производственно-технологической, организационно-управленческой, научно-исследовательской и проектной деятельности. Профессиональная деятельность выпускников данной УГС, чаще всего, связана с химической, пищевой, фармацевтической промышленностью и смежными с ней отраслями экономики.

Обязательным разделом вариативной части каждой образовательной программы согласно ФГОС ВО является Блок 2 «Практики», а который входят учебная и производственная практики, первая из которых направлена на получение обучающимися первичных профессиональных умений и навыков, в том числе первичных умений и навыков научно-исследовательской деятельности, а вторая подразделяется на несколько типов: практика по получению профессиональных умений и опыта профессиональной деятельности, технологическая практика, научно-исследовательская работа и преддипломная практика. Следовательно, практика - это один из важнейших элементов образовательного процесса в вузе и средство повышения качества подготовки и воспитания обучающихся, способных творчески применять в практической деятельности достижения научно-технического и культурного прогресса. В настоящее время в рамках высшей школы эффективно организованная ежегодная практика рассматривается как одна из актуальных форм успешной подготовки студентов, которая позволяет закрепить и расширить объем усвоенного материала той или иной учебной дисциплины.

Одной из приоритетных целей научной деятельности в вузе является производство, распространение и применение новых знаний в образовательном процессе, а, следовательно, обеспечение интеграции исследовательского и образовательного процесса. Привлечение и бакалавров и магистрантов к выполнению научных и научно-технических проектов вуза или научно-исследовательского института, позволяет использовать их творческий потенциал для решения актуальных задач современной химии, химической технологии и биотехнологии, является продолжением и углублением учебного процесса и организуется непосредственно на кафедрах, в научно-исследовательских и промышленных лабораториях. Это дает возможность использовать результаты практик для подготовки научных статей, патентов, устных или стендовых докладов на конференциях, участия в конкурсе студенческих работ. Работа в реальных условиях помогает студентам уже в период практик осознать выбор своей профессиональной деятельности, наметить направление будущей работы и по окончании обучения быстрее освоиться с производственными задачами.

Студенты знакомятся с нормами профессиональной этики при прохождении практики на предприятиях и в научно-исследовательских лабораториях. Творческое развитие личности обучающегося, его тесное сотрудничество с научным руководителем, руководителями практики на предприятиях и в организациях, позволяет сформировать у выпускника целостный взгляд на современный мир, как в профессиональном, так и в мировоззренческом плане. Таким образом достигается целостность и непрерывность образовательного процесса, обеспечивается более глубокое понимание материала и формируется основа выпускной квалификационной работы.

UDC 378.14

## ROLE OF PROFESSIONAL INTERNSHIP IN TRAINING OF BACHELORS AND MASTERS IN THE SPECIALTIES GROUP «INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY»

**M.G. Sulman, E.M. Sulman, G.N. Demidenko**

*Tver State Technical University, Tver, Russia  
A. Nikitin str. 22, 170026, Tver, Russia  
e-mail: sulman@online.tver.ru*

Job training is necessary for developing the students' ability to think independently, gaining and using knowledge, making deliberate decisions and thoroughly planning their professional activity. Job training is a key element of the educational process and the basis for the graduation paper.

**Key words:** job training, biotechnology, higher education.

The foundation of the Russian educational policy is high standard of education characterized by its fundamentality and meeting the modern needs of the individual, society and the state. University graduates should think independently, gain and use knowledge, make deliberate decisions and thoroughly plan their activity, oriented towards innovation technologies. Thus, students' training is impossible without their participation in the advanced research, their involvement in the work of the enterprises and organizations of all the branches of the national economy.

The educational program of the specialties group 190000 «Industrial ecology and biotechnology» including «Biotechnology», «Foodstuffs from plant raw material», «Foods of animal origin», «Technology of production and food service management», «High-technology production of functional and specific food products» provides graduates preparation for engineering and manufacturing, organizational, research and project activities. They choose chemical, food, pharmaceutical and related industries as a career.

Practical and job training are included in the compulsory component of the educational program variable part according to the Federal State Educational Standard. Practical training is aimed at acquiring primary professional skills, including primary research skills. Job training is divided into several types: that of getting professional skills and job experience, technological, research and pre-graduation practical training. Thus, job training is a key element of the educational process at University which helps increase the quality of the education of the students who are able to use creatively the achievements of technological and cultural progress in their practical activity. Now in higher educational establishments effectively organized annual job training is one of the up-to-date forms of students training which allows consolidating and enlarging the content of any subject.

One of the primary objectives of scientific activity of the higher school is obtaining, spreading and using of the new knowledge in the educational process and therefore integrating research and educational processes. Both undergraduates and graduates participation in scientific, research and technology projects of University or research Institute allows applying their creativity to the solution of the up-to-date problems of modern chemistry, chemical engineering and biotechnology. It is the continuation of the educational process and is organized at the departments and in research and industrial laboratories. The results of the job training can be used for the preparation of papers, patents for an invention and utility model patents, oral or posters presentations at the conferences, participation in the students' projects contest. Job training helps students to make the final choice of their career, realize job prospects and get accustomed to the production tasks after graduation.

Students are made aware of the professional ethics during their job training at the enterprises and in the research laboratories. The holistic view of the world is formed through the student's personality creative development, close cooperation with the scientific advisor, supervisors at the enterprises and in the organizations. Thus, the continuity of the educational process is achieved; in-depth content understanding is provided and the basis for the graduation paper is formed.

УДК 637.514.92

## ТЕНДЕНЦИИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫХ ПРОГРАММ ПО УГСН 19.00.00 ПРОМЫШЛЕННАЯ ЭКОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИИ В СООТВЕТСТВИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ РАБОТОДАТЕЛЕЙ В ДВ РЕГИОНЕ

Каленик Т.К. <sup>1</sup>, Мезенова О.Я. <sup>2</sup>, Ищенко С.А. <sup>3</sup>, Косенко Т.А. <sup>1</sup>, Ли Н.Г. <sup>1</sup>, Разгонова М.П. <sup>1</sup>, Моткина Е.В. <sup>1</sup>

e-mail: kalenik.tk@dvmfu.ru

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Дальневосточный Федеральный Университет» Школа биомедицины, Владивосток, Россия.

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет», кафедра пищевой биотехнологии, Калининград, Россия.

<sup>3</sup> ППО «Никольск», Уссурийск, Россия.

В настоящее время модернизация образовательных программ проходит в соответствии с потребностями работодателей.

**Ключевые слова:** высшее образование, биотехнология, магистратура, образовательная программа.

Одна из основных задач высшего образования является совершенствование высшего образования, преобразование и внедрение практической составляющей учебного процесса для формирования высококвалифицированного специалиста, необходимого работодателю, успешно освоившего все виды компетенций в соответствии с требованиями стандарта [1]. Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета реализует подготовку студентов по укрупнённой группе специальностей 19.00.00 «Промышленная экология и биотехнология». Качество образования, совершенствуется за счет интеграции образовательных технологий и практической составляющей на действующих предприятиях пищевой промышленности.

Преобразование образовательных программ идет в соответствии с современными требованиями рынка труда и работодателей. Совместно с Ассоциацией предприятий пищевой и перерабатывающей промышленности «Никольск» Дальневосточного региона был разработан образовательный стандарт нового поколения по направлению подготовки 19.04.05 Высокотехнологичные производства пищевых продуктов функционального и специализированного назначения, в котором были учтены требования работодателей к качеству высшего образования.

Литература:

1. Болгова М.А., Ветрова Е.А., Имидж, бренд и позиционирование образовательной организации высшего образования в условиях модернизации системы высшего образования // Вестник Тамбовского университета. Серия: Гуманитарные науки. 2015. № 7 (147). С. 89-93

УДК 637.514.92

## TRENDS OF PERFECTION OF EDUCATIONAL PROGRAMS ON TOSHNIS 19.00.00 INDUSTRIAL ECOLOGY AND BIOTECHNOLOGY IN ACCORDANCE WITH THE REQUIREMENTS OF EMPLOYERS IN THE EAST REGION

Kalenik T.K. <sup>1</sup>, Mezenova O.J. <sup>3</sup>, Ishchenko S.A. <sup>3</sup>, Kosenko T.A. <sup>1</sup>, Lee N.G. <sup>1</sup>, Razgonova M.P. <sup>1</sup>, Motkina E.V. <sup>1</sup>

e-mail: kalenik.tk@dvmfu.ru

<sup>1</sup> FGAOU VO Far Eastern Federal University, School of Biomedicine, Vladivostok, Russia.

<sup>2</sup> FGBOU VO Kaliningrad State Technical University, Department of Food Biotechnology, Kaliningrad, Russia.

<sup>3</sup> PPO "Nikolsk", Ussuriysk, Russia.

Currently, the modernization of educational programs is in accordance with the needs of employers.

**Key words:** higher education, biotechnology, magistracy, educational program.

One of the main tasks of higher education is the improvement of higher education, the transformation and implementation of the practical component of the educational process for the formation of a highly qualified specialist, necessary for the employer, who successfully mastered all types of competencies in accordance with

the requirements of the standard [1]. The School of Biomedicine of the Far Eastern Federal University implements the preparation of students on a large group of specialties 19.00.00 "Industrial ecology and biotechnology". The quality of education is improved due to the integration of educational technologies and practical components at the operating enterprises of the food industry.

The transformation of educational programs is in accordance with the modern requirements of the labor market and employers. Together with the Association of Food and Processing Industries of the "Nikolsk" of the Far Eastern Region, a new generation educational standard was developed in the direction of preparation. 19.04.05 High-tech food production of functional and specialized purposes, which took into account the requirements of employers for the quality of higher education.

#### References.

1. Bolgova MA, Vetrova EA, Image, brand and positioning of educational organization of higher education in conditions of modernization of higher education system // *Bulletin of Tambov University. Series: The humanities*. 2015. No. 7 (147). Pp. 89-93.

УДК 378.147.88

## ФОРМИРОВАНИЕ ПЕДАГОГИЧЕСКИХ КОМПЕТЕНЦИЙ ПРИ ПОДГОТОВКЕ МАГИСТРОВ-БИОТЕХНОЛОГОВ

Красноштанова А. А., Кузнецов А. Е.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
 125047, Москва, Миусская пл., д.9, РХТУ имени Д.И. Менделеева.  
 e-mail: aak28@yandex.ru

Приведены компетенции, относящиеся к педагогической деятельности, для магистрантов, обучающихся по направлению 19.04.01 «Биотехнология». Дана характеристика различных вариантов проведения, контроля и оценки педагогической практики магистрантов кафедры биотехнологии РХТУ имени Д.И. Менделеева.

**Ключевые слова:** магистры, биотехнология, ФГОС, педагогическая деятельность, педагогические технологии, профессиональные компетенции, педагогическая практика.

В соответствии с Федеральным Государственным образовательным стандартом (ФГОС) направления подготовки 19.04.01 «Биотехнология» одним из видов деятельности выпускника магистратуры является педагогическая [1]. В проекте ФГОС 3++ целенаправленно формируемые универсальные и общепрофессиональные педагогические компетенции не выделены и не предполагают получения специального педагогического образования. Педагогические компетенции формируются как профессиональные в рамках профильных образовательных программ и могут быть охарактеризованы и оценены как: готовность к проведению учебных занятий: семинаров, практических занятий и лабораторных практикумов; готовность к подготовке учебных и учебно-методических материалов; способность осваивать и использовать современные образовательные технологии.

С целью развития вышеуказанных компетенций магистранты 1-го курса кафедры биотехнологии РХТУ имени Д.И. Менделеева во 2-ом семестре проходят педагогическую практику. Практика проводится на базе выпускающей кафедры в рассредоточенной форме в свободное от учебных занятий время. Её общая трудоемкость составляет 6 зачётных единиц (216 академических часов) [2].

В ходе прохождения педагогической практики предполагается решение студентами следующих задач: подготовка и проведение различных видов учебных занятий со студентами бакалавриата по профильным дисциплинам; участие в разработке учебных и учебно-методических материалов, в том числе и в электронном виде; руководство научно-исследовательской работой студентов младших курсов. Студенты могут выбирать либо одно направление деятельности, например, проведение учебных занятий лабораторного практикума, либо несколько видов деятельности, например, участие в проведении Дня открытых дверей, в проекте «Университетские субботы», в подготовке 1-2 ознакомительных лекций для сокурсников по теме магистерской диссертации и проведение одного семинара или лабораторного занятия. Отчет по практике дополняется отзывом руководителя с оценкой степени самостоятельности магистранта при выполнении заданий практики и развития компетенций, относящихся к педагогической деятельности. Зачёт по педагогической практике выставляется по следующим критериям: отзыв руководителя, содержание отчета, качество выступления (в случае защиты в виде презентации), уровень

ответов на вопросы.

Прохождение педагогической практики способствует формированию у магистрантов навыков практического применения полученных теоретических знаний и овладению современными педагогическими технологиями.

Литература:

1. Федеральный государственный образовательный стандарт высшего образования по направлению подготовки 19.04.01, утвержденный Министерством образования и науки Российской Федерации от 21.11.2014 № 1495 (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 19.12.2014 г., регистрационный № 35275).

2. Реформирование биотехнологического образования на основе Болонского процесса: Методическое пособие : в 3 т. Т.3 /Под. ред. А.Е. Кузнецова / А. Астромскиене, Е. С. Бабусенко, Д. В. Баурин и др. — Лаборатория знаний Москва, 2017. — С. 865.

UDC 378.147.88

## FORMATION OF PEDAGOGICAL COMPETENCIES AT MASTERS-BIOTECHNOLOGIES TRAINING

Krasnoshtanova AA, Kuznetsov A.Ye.

D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia  
125047, Moscow, Miusskaya sq., 9  
e-mail: aak28@yandex.ru

Competences relating to pedagogical activity for masters studying in the course of 19.04.01 "Biotechnology" are listed. The characteristic of various modes of pedagogical practice for carrying out, control and learning outcomes assessment for masters training at the Department of Biotechnology of D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia is given.

**Key words:** masters, biotechnology, the Federal State Educational Standard, pedagogical activity, pedagogical technologies, professional competence, pedagogical practice.

In accordance with the Federal State Educational Standard (FSSES) on training in the field of 19.04.01 "Biotechnology" the pedagogical activity is one of the activities for masters-biotechnologies [1]. In the draft of FSSES 3++ purposefully formed universal and general pedagogical competences are not allocated and the obtaining a special pedagogical education do not presuppose.

Pedagogical competences are formed as professional in the framework of profile educational programs and can be characterized and assessed as: readiness for training studies: seminars, practical classes and laboratory workshops; readiness to prepare training and educational materials; the ability to developing and using modern pedagogical technologies.

With the purpose of the above-mentioned competencies development, first-year master's students of the Department of Biotechnology of D. Mendeleev University of Chemical Technology have a pedagogical practice in the second semester. The practice is held on the basis of the profile department in a dispersed form during the time free from training. Her total labor intensity is 6 credits (216 academic hours) [2].

In the course of the pedagogical practice, students are expected to solve the following tasks: preparation and carrying out of various types of training studies with undergraduate students on profile courses; participation in the development of educational and educational-methodical materials, including the electronic form; assistance on research work of students from junior courses. Students can choose either one form of the activity, for example, carrying out practical trainings, or several activities, for example, participating in the Open Day, in the "University Saturdays" project, in preparing 1-2 trial lectures for students on the theme of the master's thesis and carrying out one seminar or laboratory work. The report on practice is supplemented by a review of the guide with an assessment of the degree of independence of the student in the performance of tasks on practice and development of competences related to pedagogical activity. The results for the pedagogical practice are set according to the following criteria: a review of the guide, the contents of the report and the quality of the presentation (in the case of defence in the form of a presentation), the level of answers to questions.

Pedagogical practice contributes to the formation of skills for masters to apply their theoretical knowledge and modern pedagogical technologies.

*References:*

- 1. The Federal State Educational Standard of higher education in the field of training 19.04.01, approved by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation on November 21, 2014 No. 1495 (registered by the Ministry of Justice of the Russian Federation on December 19, 2014, registration No. 35275).*
- 2. Reforming of biotechnological education on the basis of the Bologna process: Methodical manual: in 3 volumes V.3 / edited by A. Ye. Kuznetsov / A. Astromskiene, E. S. Babusenko, D. V. Baurin and etc. - Laboratory of Knowledge Moscow, 2017. - P. 865.*

## СОВРЕМЕННЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

### MODERN BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE

1. АМПЛИФИКАЦИЯ СИГНАЛА В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ФИТОПАТОГЕНОВ, Сафенкова И.В., Панферов В.Г., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. ....	799
SIGNAL AMPLIFICATION FOR LATERAL FLOW IMMUNOASSAY OF PHYTOPATHOGENS, Safenkova I.V., Panferov V.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	800
2. ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ НА МЕТАБОЛОМИКУ СОИ (GLYCINE MAX L. MERR) И КУКУРУЗЫ (ZEA MAYS L.), Горькова И.В., Павловская Н.Е., Костромичева Е.В., Гагарина И.Н. ....	800
INFLUENCE OF GENETIC TRANSFORMATION ON SOI METABOLOMICS (GLYCINE MAX L. MERR) AND CORN (ZEA MAYS L.), Gorkova I.V., Pavlovskaya N.E., Kostromicheva E.V., Gagarina I.N. ....	801
3. ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА ОБЛУЧЕНИЯ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА, Мартиросян Ю.Ц., Мартиросян Л.Ю., Маврин М.В., Гарибян Ц.С., Мартиросян В.В., Кособрюхов А.А. ....	802
INFLUENCE OF SPECTRAL COMPOSITION OF IRRADIATION ON THE PHOTOSYNTHETIC CHARACTERISTICS OF CUCUMBER PLANTS, Martirosyan Yu.Ts. Mavrin M.V., Martirosyan L.Yu., Garibyan Ts. C., Martirosyan V.V., Kosobryukhov A.A. ....	803
4. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НА РОСТ СООБЩЕСТВА МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, Самосадов М.С., Семенова В.А., Суясов Н.А. ....	804
THE INFLUENCE OF CONCENTRATION ON GROWTH OF COMMUNITY OF METHANE OXIDIZING MICROORGANISMS, Samosadov M.S., Semenova V.A., Suyasov N.A. ....	805
5. ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА, Урусов А.Е., Бартош А.В., Губайдуллина М.К., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. ....	806
HIGHLY SENSITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST-SYSTEMS FOR AGRICULTURE, Urusov A.E., Bartosh A.V., Gubaidullina M.K., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ....	806
6. ГЕНЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА КАК ФАКТОР ИНДУЦИРОВАНИЯ МУТАЦИЙ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, Боме Н.А., Королев К.П., Тетяников Н.В., Вайсфельд Л.И., Боме А.Я. ....	807
GENETICALLY ACTIVE SUBSTANCES AS THE FACTOR OF INDUCING MUTATIONS IN AGRICULTURAL PLANTS, Bome N.A., Korolev K.P., Tetyannikov N.V., Weissfeld L.I., Bome A.Y. ....	808
7. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ, Симагина П.В., Гришина А.Н., Суясов Н.А., Бондарева Г.М. ....	809
STUDYING THE PROPERTIES OF THE MICROBIAL COMMUNITY OF METHANE OXIDIZING MICROORGANISMS, Simagina P.V., Grishina A.N., Suyasov N.A., Bondareva G.M. ....	810
8. ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ САМПУЛОБАКТЕР JEJUNI К ВОЗДЕЙСТВИЮ БИОЦИДОВ, Стеценко В.В., Быкова И.Б., Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А. ....	811
STUDY OF THE SENSITIVITY OF CAMPYLOBACTER JEJUNI STRAINS TO THE INFLUENCE OF BIOICIDES, Stetsenko V.V., Bikova I.B., Efimochkina N.R., Sheveleva S. A. ....	812
9. ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК AJUGA TURKESTANICA, Харитонов Т.Д., Титова М.В., Соболюкова Г.И., Чернобурова Е.И., Заварзин И.В., Носов А.М. ....	815
THE STUDY OF THE CONTENT OF PHYTOECDYSTERIODS IN THE CULTURE OF CELLS OF AJUGA TURKESTANICA, Kharitonov T.D., Titova M.V., Sobolkova G.I., Chernoburova E.I., Zavarzin I.V., Nosov A.M. ....	814
10. ЛАЗЕРНАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ СТРЕССЕ, Дерюгина А.В., Самоделкин А.Г., Иващенко М.Н., Белов А.А. ....	815
LASER INTERFERENCE MICROSCOPY USED FOR THE EXAMINATION OF CATTLE RBC RESISTANCE DURING THE TECHNOLOGICAL STRESS, Deryugina A.V., Samodelkin A.G., Ivashchenko M.N., Belov A.A. ....	816



11. МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАННЕГО ИММУННОГО ОТВЕТА МХА <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i> В ОТВЕТ НА ПАТОГЕНЕЗ, Е.Д.Егорова, Н.А.Сухих, С.В.Виноградова .....	816
METABOLIC REGULATION OF THE EARLY IMMUNE RESPONSE OF THE MOSS <i>PHYSCOMITRELLA PATENS</i> TO PATHOGENESIS, E.Egorova, N.Sukhikh, S.Vinogradova .....	818
12. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ БИОПРЕПАРАТОВ – СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ, Зайцев Г.А., Сафронова В.И., Сазонова А.Л., Жилинская Н.Т., Базарнова Ю.Г. ....	820
MOLECULAR-GENETIC CERTIFICATION OF COMMERCIAL MICROORGANISM STRAINS USED IN BIOLOGICALS AS AN AGRICULTURAL CROP GROWTH STIMULATOR, Zaycev G.A., Safronova V.I., Sazonova A.L., Zhilinskaia N.T., Bazarnova I.G. ....	821
13. НОВЫЕ ГОМОЛОГИ NB-LRR ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ У СЛОЖНЫХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ КАРТОФЕЛЯ, Фади́на О.А., Бекетова М.П., Кузнецова М.А., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. ....	822
LATE BLIGHT RESISTANCE GENES IN COMPLEX INTERSPECIFIC POTATO HYBRIDS, O. A. Fadina, M. P. Beketova, M. A. Kuznetsova, E.V. Rogozina, E.E. Khavkin .....	823
14. НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИСПОЛЬЗОВАНИИ СВЕТОДИОДНЫХ ОБЛУЧАТЕЛЕЙ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В РАСТЕНИЯХ, Мартиросян Ю.Ц., Кособрюхов А.А., Мартиросян В.В., Мартиросян Л. Ю. ....	823
NEW APPROACHES IN THE USE OF LED IN THE STUDY OF PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL PROCESSES IN PLANTS, Martirosyan Yu.C., Kosobryukhov A.A. 1.2 Martirosyan V.V.1, Martirosyan I.Yu. 1,3. ....	824
15. ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> , Питайкина А. В., Яценко Е. С., Ильина Е. Г., Ширманов М. В., Евдокимов И. Ю. ....	824
OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF <i>BACILLUS SUBTILIS</i> BACTERIA, Pitaikina A. V., Yatsenko E. S., Ilyina E. G., Shirmanov M. V., Evdokimov I. Yu. ....	826
16. О ПЕРСПЕКТИВАХ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ АМАРАНТОВОГО СИЛОСА, Павленкова С.В., Толкачева А.А., Анненков В.А., Корнеева О.С. ....	827
APPLICATION OF RECOMBINANT HYDROLYTIC ENZYMES IN THE PRODUCTION OF AMARANTH SILAGE, Pavlenkova S.V., Tolkacheva A.A., Annenkov V.A., Korneeva O.S. ....	828
17. ПРЕДПОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА СЕМЯН, Гарибян Ц. С., Акопян В. Б., Воробьева Г. И., Мартиросян Л. Ю. ....	829
SEWING PREPARATING PROCESSING, Gharibyan Ts. S., Akopyan V. B., Vorobiova G. I., Martirosyan L. Yu. ....	829
18. ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИЭНЗИМНОГО ПРЕПАРАТА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ СБРАЖИВАЕМЫХ УГЛЕВОДОВ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ АМАРАНТА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ВЫСОКОБЕЛКОВОГО АМАРАНТОВОГО СИЛОСА, Павленкова С.В., Исаева А.В., Свиридова Т.В., Шуваева Г.П., Мирошниченко Л.А., Корнеева О.С. ....	830
THE USE OF MULTIENZYME PREPARATION WITH THE AIM OF INCREASING FERMENTABLE CARBOHYDRATES IN GREEN MASS OF AMARANTH IN OBTAINING HIGH-PROTEIN AMARANTH SILAGE, Pavlenkova S.V., Isaeva A.V., Sviridova T.V., Shuvaeva G.P., Miroshnichenko L.A., Korneeva O.S. ....	831
19. СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ СО <sub>2</sub> -ЭКСТРАКЦИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ СОЕДИНЕНИЙ ГИНЗЕНОЗИДОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ДИКОРАСТУЩЕГО ЖЕНЬШЕНЯ <i>Panax ginseng</i> С.А. Meyer, М.П. Разгонова, Т.К. Каленик .....	832
SUPERCRITICAL CO <sub>2</sub> -EXTRACTION IN THE STUDY OF GINSENOSES OBTAINED FROM WILD-GROWING GINSENG <i>Panax ginseng</i> С.А. Meyer, Razgonova M.P., Kalenik T.K. ....	833
20. СКРИНИНГ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ 35-S, FMV, NOS и СТР2-СР4-EPSPS В КОРМАХ И КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ С 2016 ПО 2017 гг., Гузеева А.А., Цыдыпова О.Ц., Спиридонов А.В., Капитова И.А. ....	835
SCREENING of 35-S, FMV, NOS and СТР2-СР4-EPSPS REGULATORY SEQUENCES IN FEEDS AND FEED ADDITIVES FROM 2016 to 2017, Guzeeva A. A., Tsydyпова O. C, Spiridonov A.V., Kapitonov I. A. ....	836
21. СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, В ТОМ ЧИСЛЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ, Савченкова И.П., Васильева С.А., Коровина Д.Г., Викторова Е.В., Волкова И.М., Савченкова Е.А. ....	837
FORMATION OF THE MAMMALIAN STEM CELLS COLLECTION, INCLUDING FARM ANIMALS, Savchenkova I.P, Vasilieva S.A., Korovina D.G., Viktorova E.V., Volkova I.M., Savchenkova E.A. ....	838
22. СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ ЛЬНА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА, К.П.Королев .....	838

CREATION OF NEW FORMS OF FLAX BASED ON THE METHOD OF INDUCED MUTAGENESIS, K.Korolev .....	839
23. СТИМУЛЯТОР РОСТА БАКТЕРИЙ BACILLUS SUBTILIS, Рыженков Н. С., Яценко Е. С., Ширманов М. В., Евдокимов И. Ю., Микушина И. В. ....	840
STIMULATOR OF BACILLUS GROWTH BACILLUS SUBTILIS, Ryzhenkov N. S., Yatsenko E. S., Shirmanov M. V., Evdokimov I. Yu. Mikushina I. V. ....	841
24. СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ «СИМБИОНТ», Таразанова Т.В. ....	842
STIMULATORS OF PLANT GROW "SYMBIONT", Tarazanova T.V. ....	843
25. ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА В КОРНЯХ ХРЕНА ОБЫКНОВЕННОГО (ARMORACIA RUSTICANA), Мартиросян Л.Ю., Сазыкин А.Ю., Дядищева Т.Р., Мартиросян В.В., Топорова В.А., Алиев Т.К., Мартиросян Ю.Ц. ....	844
TRANSIENT EXPRESSION OF HUMAN BUTYRYLCHOLINESTERASE IN THE ROOTS OF HORSE RADISH (ARMORACIA RUSTICANA), Martirosyan L. Y., Sazykin, A. Y1., Dyadisheva T. R., Martirosyan V. V., Toporova V. A., Aliev T. K., Martirosyan Y. C. ....	845
26. ФОРМИРОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ МЕХАНИЗМОВ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ В ОТВЕТ НА КРАТКОВРЕМЕННУЮ ОБРАБОТКУ БРАССИНОСТЕРОИДАМИ ПРИ ХЛОРИДНОМ ЗАСОЛЕНИИ, Ефимова М.В., Бойко Е.В., Ковтун И.С., Кузнецов Вл.В. ....	847
SALT TOLERANCE IN POTATO PLANTS INDUCED BY SHORT-TERM BRASSINOSTEROID TREATMENT, Efimova M.V., Boyko E.V., Kovtun I.S. Kuznetsov V.V. ....	848

УДК 543.9

## АМПЛИФИКАЦИЯ СИГНАЛА В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ФИТОПАТОГЕНОВ

Сафенкова И.В., Панферов В.Г., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН  
119071 Москва, Ленинский проспект, д.33  
e-mail: irina.safenkova@gmail.com

Предложены методы амплификации сигнала в иммунохроматографическом анализе, позволяющие повысить чувствительность тест-систем. Показано, что использование амплификации для детекции вирусных и бактериальных фитопатогенов позволяет снизить предел обнаружения до 32 раз.

**Ключевые слова:** амплификация сигнала, иммунохроматография, картофель, фитопатогены, экспресс-анализ

Для своевременной диагностики заболеваний сельскохозяйственных растений крайне важно экспрессное тестирование в полевых условиях с чувствительностью, выявляющей латентные инфекции. В настоящей работе предложено два метода амплификации сигнала в иммунохроматографическом анализе (ИХА), которые обеспечивают выявление патогенов в низких концентрациях, не вызывающих симптомов у пораженных растений (для вирусов <10 нг/мл, для бактерий <104 кл./мл). Методы апробированы на примерах основных патогенов картофеля: X-вируса картофеля и бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Для первого метода показано, что сочетание функционализированных магнитных наночастиц (МНЧ) и золотых наночастиц (НЧЗ) позволяет снизить предел обнаружения в 32 раза по сравнению с традиционным ИХА, в котором используются только НЧЗ. Эффект основан на магнитном концентрировании и образовании в ходе ИХА гетероагрегатов между конъюгатами МНЧ – биотинилированные специфические антитела и НЧЗ – стрептавидин.

Второй метод амплификации, основанный на накоплении продуктов ферментативной реакции, реализован с использованием щелочной фосфатазы. Для введения фермента применена схема с двумя конъюгатами: (НЧЗ – фермент – антивидовые антитела) и (НЧЗ – антитела, специфичные к патогену). Предел обнаружения данного ИХА после добавления субстратной смеси в 27 раз ниже по сравнению с традиционным ИХА.

Разработанные методы амплификации не требуют много времени ( $\leq 10$  минут), выполняются без использования дополнительного оборудования.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04108).

UDC 543.9

## SIGNAL AMPLIFICATION FOR LATERAL FLOW IMMUNOASSAY OF PHYTOPATHOGENS

Safenkova I.V., Panferov V.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.

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

The use of the signal amplification in lateral flow immunoassay was proposed to increase the sensitivity of test systems. For the detection of viral and bacterial phytopathogens the amplification reduces the detection limit up to 32 times.

**Key words:** lateral flow immunoassay, potato, phytopathogens, rapid tests, signal amplification

For timely diagnosis of crops diseases, rapid testing in the field with sensitivity detecting latent infections is extremely important. In the present work, two methods amplifying the signal of the lateral flow immunoassay (LFIA) are proposed, which provide detection of pathogens in low concentrations that do not cause symptoms in affected plants (for viruses <10 ng/mL, for bacteria <104 cells/mL). The developed methods have been tested for the main pathogens of potato: potato virus X virus and the bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

For the first method, the combination of functionalized magnetic nanoparticles (MNPs) and gold nanoparticles (GNPs) allows reducing the detection limit by 32 times in comparison with the traditional LFIA. The effect is based on the magnetic concentration and the formation of heteroaggregates between the (MNP – biotinylated specific antibodies) and the (GNP – streptavidin) conjugates in the LFIA.

The second method of amplification that is based on the accumulation of the product of the enzymatic reaction has been realized with the use of alkaline phosphatase. For the enzyme amplification, a scheme with two conjugates was applied: (GNP – enzyme – anti-species antibodies) and (GNP – antibodies specific for the pathogen). The limit of detection of this LFIA after addition of a substrate mixture is 27 times lower compared with the traditional LFIA.

The developed methods of amplification in LFIA do not require much time ( $\leq 10$  minutes) and are performed without the use of additional equipment.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Project № 16-16-04108).

УДК631.95

## ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ НА МЕТАБОЛОМИКУ СОИ (GLYCINE MAX L. MERR) И КУКУРУЗЫ (ZEA MAYS L.)

Горькова И.В., Павловская Н.Е., Костромичева Е.В., Гагарина И.Н.

*ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет»  
Орел, Россия  
302019, Орел, ул. Генерала Родина, д.62, кв.29  
e-mail ninel.pavlovsckaya@yandex.ru*

В процессе работы проведен анализ современной литературы по влиянию генно-инженерных трансформаций на физиологические изменения и обмен веществ растений, показывающий противоречивые данные о пользе и вреде сортов с ГМО.

**Ключевые слова:** соя, кукуруза, генномодифицированные организмы, лектины, химитрипсинингибирующая активность, антиоксидантная система.

Объектом исследования служили сорта сои (*Glycine max* L. Merr) и кукурузы (*Zea mays* L.) отечественной и зарубежной селекции, в том числе и генно- трансформированные.

Исследование содержания и состава запасных белков методом ЭФ в семенах и проростках генно-трансформированных растений не выявило различий между семенами ГМО сортов сои и кукурузы и негенномодифицированными.

Установлено, что трипсинингибирующая активность семян во всех образцах сои и кукурузы примерно в 2 раза ниже, по сравнению с химитрипсинингибирующей активностью. Активность ТИА в генно-модифицированных образцах сои примерно в 1,5 раза ниже, чем в образцах негенномодифицированных, а активность ХИА, напротив, у генно-трансформированных семян сои в 2-2,5 раза выше, чем у негенномоди-

фицированных образцов.

Выявлена высокая активность лектинов в генномодифицированных семенах сои и кукурузы, что на 20-30 % больше, чем у негенномодифицированных образцов.

Установлено снижение активности ацетилхолинэстеразы у генно-трансформированных образцов сои и кукурузы по сравнению с обычными сортами. Активность АТФ-азы резко падает у семян сои с генными трансформациями, что указывает на нарушение проницаемости мембран. У генно-трансформированных семян кукурузы активность АТФ-азы, напротив, выше в 2-3 раза, чем у нетрансформированных, что связано, видимо, с особенностями метаболизма у злаковых культур, относящихся к С4-типу фотосинтеза.

Не установлено значительного отклонения показателей активности супероксиддисмутазы в процессе прорастания семян сои негенномодифицированных сортов по сравнению с ГМО. Однако, у кукурузы отмечено снижение активности этого важного антиоксиданта у генетически трансформированных сортов по сравнению с обычными.

Нет существенных отличий у генно-модифицированных образцов сои по содержанию низкомолекулярных компонентов антиоксидантной системы витаминов А и С по сравнению с обычными семенами. У генномодифицированной кукурузы имеется тенденция снижения содержания этих витаминов по сравнению с обычными семенами. По содержанию токоферола (витамина Е) отмечается тенденция его снижения у ГМО-образцов и сои и кукурузы.

Видимых отклонений по содержанию малонового диальдегида ни у генно-модифицированной сои, ни у кукурузы, по сравнению с обычными образцами, не выявлено.

Проведенный контроль безопасности растений с генно-инженерными трансформациями на белых лабораторных мышах показал несущественные отклонения между мышами разных групп. В пределах физиологической нормы.

Работа поддержана грантом Министерством сельского хозяйства РФ. Протокол заседания Научно-технического совета (НТС) университета от 27.12.2016 г. № 1

UDK 631.95

## INFLUENCE OF GENETIC TRANSFORMATION ON SOI METABOLOMICS (GLYCINE MAX L. MERR) AND CORN (ZEA MAYS L.)

*Gorkova I.V., Pavlovsckaya N.E., Kostromicheva E.V., Gagarina I.N.*  
The Orel state agricultural university  
Orel, Russia  
302019, Orel, apt 29 62 street of Gentrala Rodina  
e-mail [ninel.pavlovsckaya@yandex.ru](mailto:ninel.pavlovsckaya@yandex.ru)

In the course of the work, an analysis of contemporary literature on the influence of genetic engineering transformations on the physiological changes and metabolism of plants is conducted, showing conflicting data on the benefits and harms of varieties with GMO.

**Key words:** soybean, maize, genetically modified organisms, lectins, chemitrypsinin inhibitory activity, antioxidant system.

The object of the study was soybean varieties (*Glycine max L. Merr*) and maize (*Zea mays L.*) of domestic and foreign breeding, including genetically transformed varieties.

The study of the protein content and composition by the EF method in seeds and seedlings of genetically transformed plants showed no differences between the GMO seeds of soybean and maize varieties and the non-genetically modified ones.

It has been established that the trypsinin inhibitory activity of seeds in all samples of soy and corn is approximately 2 times lower, as compared to chemitrypsinin-inhibiting activity. The activity of TIA in genetically modified soybean samples is approximately 1.5 times lower than in samples of non-genetically modified ones, and the activity of HIA, in contrast, in genetically transformed soybean seeds is 2-2.5 times higher than in non-genetically modified samples.

The high activity of lectins in genetically modified soybean and maize seeds was detected, which is 20-30% more than for nongenommodified samples.

A decrease in the activity of acetylcholinesterase in genetically transformed samples of soybean and maize was found in comparison with conventional varieties. The activity of ATP drops sharply in soybean seeds with gene transformations, which indicates a violation of membrane permeability. In genetically transformed maize seeds,

the activity of ATP, on the other hand, is 2-3 times higher than that of untransformed, which is probably due to the metabolic peculiarities of cereal crops belonging to the C4-type of photosynthesis.

There was no significant deviation in the indices of activity of superoxide dismutase in the process of germination of soybean seeds of non-genetically modified varieties in comparison with GMO. However, corn showed a decrease in the activity of this important antioxidant in genetically transformed varieties in comparison with the usual ones.

There are no significant differences in the genetically modified soybean samples by the content of low molecular weight components of the antioxidant system of vitamins A and C as compared to conventional seeds. Genetically modified maize has a tendency to decrease the content of these vitamins in comparison with ordinary seeds. According to the content of tocopherol (vitamin E), there is a tendency for it to decrease in GMO samples and soy and maize.

There were no apparent deviations in the content of malonic dialdehyde in either genetically modified soybean or in maize, as compared to conventional samples.

The conducted safety control of plants with genetic engineering transformations on white laboratory mice showed insignificant deviations between mice of different groups. Within the limits of the physiological norm.

The work is supported by a grant from the Ministry of Agriculture of the Russian Federation. Minutes of the meeting of the Scientific and Technical Council (NTS) of the University of December 27, 2016 No. 1

УДК 60

## ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ НА РОСТ СООБЩЕСТВА МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Самосадов М.С., Семенова В.А., Суясов Н.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
123480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20  
e-mail: maxsamosadov@mail.ru

В настоящее время актуальным является вопрос влияния концентрации минеральных веществ на рост микроорганизмов. Все научные исследования проводились в пределах диапазона роста данных бактерий, а именно сообщества метаноокисляющих микроорганизмов р. *Methylococcus*. Работа выполнена при финансовой поддержке РХТУ им. Д.И. Менделеева. Номер проекта 033-2018.

**Ключевые слова:** метаноокисляющие микроорганизмы, концентрация минеральных солей, биотехнология

Минеральные соли, входящие в состав питательной среды, а именно соли меди, железа, цинка, марганца, кобальта, молибдена и никеля, оказывают влияние на активность метаболических процессов в клетке. Потребность метаноокисляющих микроорганизмов р. *Methylococcus* в этих компонентах зависит от фазы развития культуры, скорости ее роста и плотности микробной популяции [1]. Но до сих пор не выявлено, в каких именно концентрациях нуждаются бактерии для хорошего роста, все варьируется в пределах диапазона.

Ключевую роль в регуляции ферментной системы играют ионы меди, которые только при определенных соотношениях приводят к экспрессии данного ферментного комплекса [2]. В результате исследований на кафедре биотехнологии концентраций ионов меди было установлено, что предложенная концентрация в среде не дает максимальной удельной скорости роста микроорганизмов. При повышении концентрации, скорость роста и фаза роста биомассы значительно повысилась, а при понижении, наоборот, ничего не наблюдалось.

Ионы железа также входят в состав активных центров метанмонооксигеназы. В ходе эксперимента было выявлено, что диапазон концентрации ионов железа сильно варьируется. То есть при повышении концентрации наблюдалось значительное ингибирование роста.

При изучении влияния на ростовые характеристики метаноокисляющих микроорганизмов таких микроэлементов как марганец, бор и цинк была замечена одна тенденция: при увеличении концентрации ярко выраженного ингибирования не будет наблюдаться. Некоторые из элементов, присутствующих в сверхмалых количествах, относятся к числу необходимых. Концентрации молибдена, кобальта и никеля в малых количествах влияли на удельный рост метаноокисляющих микроорганизмов р. *Methylococcus*.

Влияние кислотности среды и температуры на рост культивирования микроорганизмов оказывает сильный эффект и носит параболический характер.

Литература:

1. 1992 Исследование влияния внеклеточных метаболитов на развитие метаноокисляющей культуры *Methylococcus capsulatus* / Бабусенко Е.С., Эль-Регистан Г.И., Градова Н.Б., Козлова А.Н., Осипов Г.А., Зайцев С.А //

*Прикладная биохимия и микробиология, издательство Наука (М.), том 28, № 5, с. 753-759*  
2. 2016 Направленное культивирование сообщества метанотрофных микроорганизмов при выращивании на газовоздушных смесях с получением различных ценных биологически активных веществ. / Суясов Н.А., Воронина В.А. // Сборник материалов Российско-Швейцарского семинара «От фундаментальных исследований к коммерциализации научных идей, место издания РХТУ им. Д.И. Менделеева Москва, тезисы, с. 40-41

UDC 60

## THE INFLUENCE OF CONCENTRATION ON GROWTH OF COMMUNITY OF METHANE OXIDIZING MICROORGANISMS

**Samosadov M.S., Semenova V.A., Suyasov N.A.**

Moscow University of Chemical Technologies of Russia, Moscow, Russia  
123480 Moscow, Geroev Panfilovtsev street, 20.  
e-mail: maxsamosadov@mail.ru

At present, the actual issue is the effect of the concentration of mineral substances on the growth of microorganisms. All scientific research was carried out within the range of growth of these bacteria, namely the community of methane-oxidizing microorganisms p. *Methylococcus*. The work was supported by Mendeleev University of Chemical Technology of Russia. Project Number 033-2018

**Key words:** methane oxidizing microorganisms, concentration of mineral salts, biotechnology.

Mineral salts included in the nutrient medium, namely salts of copper, iron, zinc, manganese, cobalt, molybdenum and nickel, affect the activity of metabolic processes in the cell. The need for methane-oxidizing microorganisms p. *Methylococcus* in these components depends on the phase of development of the culture, the rate of its growth and the density of the microbial population [1]. But until now it has not been determined which concentrations the bacteria need for good growth, everything varies within the range.

A key role in the regulation of the enzyme system is played by copper ions, which only at certain ratios lead to the expression of this enzyme complex [2]. As a result of studies at the Department of Biotechnology of copper ion concentrations, it was found that the proposed concentration in the medium does not give the maximum specific growth rate of microorganisms. With increasing concentration, the growth rate and the phase of biomass growth increased significantly, while on the contrary, nothing was observed.

Iron ions also form part of the active centers of methane monooxygenase. In the course of the experiment, it was found that the range of iron ion concentrations varies greatly. That is, with increasing concentration, significant inhibition of growth was observed.

When studying the effect on the growth characteristics of methane-oxidizing microorganisms of such trace elements as manganese, boron and zinc, one tendency was observed: as the concentration increases, pronounced inhibition will not be observed. Some of the elements present in ultra-small quantities are among the necessary. Concentrations of molybdenum, cobalt and nickel in small amounts influenced the specific growth of methane-oxidizing microorganisms p. *Methylococcus*.

The influence of the acidity of the medium and temperature on the growth of cultivation of microorganisms has a strong effect and is parabolic in nature.

### References:

1. 1992 *Issledovanie vliyaniya vnekletochnyh metabolitov na razvitie metanokislyayushchej kul'tury Methylococcus capsulatus* / Babusenko E.S., Ehl'-Registan G.I., Gradova N.B., Kozlova A.N., Osipov G.A., Zajcev S.A. // *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya, izdatel'stvo Nauka (M.), tom 28, № 5, s. 753-759*
2. 2016 *Napravlennoe kul'tivirovanie soobshchestva metanotrofnyh mikroorganizmov pri vyrashchivanii na gazovozdushnyh smesyah s polucheniem razlichnyh cennyh biologicheski aktivnyh veshchestv.* / Suyasov N.A., Voronina V.A. // *Sbornik materialov Rossijsko-SHvejcarskogo seminar "Ot fundamental'nyh issledovanij k kommercializacii nauchnyh idej, mesto izdaniya RHTU im. D.I. Mendeleeva Moskva, tezisy, s. 40-41*

## ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА ОБЛУЧЕНИЯ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ ОГУРЦА

Мартиросян Ю.Ц.<sup>1,3</sup>, Мартиросян Л.Ю.<sup>1,3</sup>, Маврин М.В.<sup>4</sup>, Гарибян Ц.С.<sup>1</sup>, Мартиросян В.В.<sup>1</sup>, Кособрюхов А.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии. 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42, e-mail: yumart@yandex.ru.

<sup>2</sup> ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290, г. Пущино, Московской область, ул. Институтская, 2.

<sup>3</sup> ФГБУН Институт биохимической физики РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

<sup>4</sup> ООО «АтомСвет», 140186, г. Жуковский, Московская область, ул. Дугина, дом 28/12.

**Ключевые слова:** светодиодные облучатели, ФАР, растения огурца, урожай

Правильный выбор светового режима выращивания растений, с учетом их физиологического состояния, является важным элементом получения качественной растительной продукции. Он зависит от потребности растений в интенсивности и спектральном составе света. Для решения проблемы снижения энергозатрат актуальным становится применение инновационных технологий – низкоэнергетических светодиодных облучателей. Они позволяют имитировать динамику суточного изменения спектрального состава солнечного света при выращивании растений, а также управлять ростом и развитием растений, ускоряя или замедляя отдельные фазы роста. Однако необходимо, чтобы в спектре светодиодных светильников, используемых для выращивания растений, были все участки видимого излучения с преобладанием красных и синих лучей, а также небольшая доля ультрафиолетового и дальнего красного света.

В задачу работы входила оценка интенсивности CO<sub>2</sub> газообмена, активности световой стадии фотосинтеза по показателям переменной флуоресценции хлорофилла а, ростовых параметров растений, длительно выращиваемых в условиях полного спектрального облучения в области фотосинтетически активной радиации (ФАР) под светодиодными облучателями и лампами ДНАТ-600. Растения огурца (*Cucumis sativus* L., гибрид Тристан F1) выращивали методом аэропоники на двух изолированных стеллажах, что давало возможность задавать необходимые параметры облучения: интенсивность и спектральный состав света.

Интенсивность фотосинтеза листьев измеряли с помощью фотосинтетической системы LCPPro+ (ADC BioScientific Ltd., Великобритания). Измеряли скорость газообмена листьев растений при интенсивности света 304 и 412 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>, соответственно под СД облучателями и лампами ДНАТ-600, т.е. при интенсивности выращивания растений, а также определяли «потенциальную» скорость газообмена при 1200 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>. Зависимость скорости фотосинтеза от интенсивности света определяли в диапазоне ФАР от 0 до 1200 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup> при концентрации CO<sub>2</sub> в воздухе 420±22 мкмоль CO<sub>2</sub> моль<sup>-1</sup>. Для этого последовательно повышали уровень интенсивности света с 0 до 1200 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup>. Переменную флуоресценцию регистрировали с помощью PAM флуориметра (PAM-Jnior, Heinz Walz, Germany). Каждые 4-7 дней определяли ростовые показатели: высоту растений, количество ярусов, диаметр корневой шейки.

Анализ распределения спектров облучения светильников показывает, что максимальное значение для продуктивности имеет «красная» часть спектра в диапазоне волн 600-700 нм. По этому показателю светодиодные светильники BIO 03-180 превосходят светильники ДНАТ 600 на 40 μmol/m<sup>2</sup>s. При этом эффективность распределения внутри «красного» участка спектра BIO 03-180 значительно лучше, чем у ДНАТ 600 – максимумы распределены на диапазон 660-680 нм, в отличие от ДНАТ 600 – максимумы в области 600-610 нм.

Показано, что у растений огурца в условиях высоких уровней облученности (304 и 412 мкмоль/м<sup>2</sup>с) и температурах 25 и 26°C формируется фотосинтетический аппарат, способный эффективно работать при повышении интенсивности света до 1200 мкмоль/м<sup>2</sup>с. Указанная закономерность в большей степени зависит от температуры (R 0,81), чем от фона освещенности (R 0,73), но в условиях средней и низкой освещенности (300 мкмоль/м<sup>2</sup>/с) ассимиляционные возможности растений определяются фоном освещенности (R 0,95). То есть увеличение интенсивности ассимиляционного света в обязательном порядке должно сопровождаться ростом дневной температуры воздуха в посевах.

Выход урожая был выше в начальный период сбора под лампами ДНАТ-600, но в последующем снижался и, в результате, общая урожайность была ниже по сравнению со светодиодными вариантами. Полученные данные свидетельствуют о возможности снижения энергетической мощности СД облучателей по сравнению с лампами ДНАТ-600, что должно обеспечить снижение потребления энергии на 30-35%.

## INFLUENCE OF SPECTRAL COMPOSITION OF IRRADIATION ON THE PHOTOSYNTHETIC CHARACTERISTICS OF CUCUMBER PLANTS

Martirosyan Yu.Ts.<sup>1,3</sup>, Mavrin M.V.<sup>4</sup>, Martirosyan L.Yu.<sup>1,3</sup>, Garibyan Ts. C.<sup>1</sup>, Martirosyan V.V.<sup>1</sup>, Kosobryukhov A.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> FGBNU VNII Agricultural Biotechnology; 127550, Moscow, Timiryazevskaya, 42.

<sup>2</sup> FGBUN Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, 142290, Pushchino, Moscow Region.

<sup>3</sup> FGBUN Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334, Moscow, Kosigina 4.

<sup>4</sup> "AtomSvet" Ltd, 140186, Zhukovsky, Moscow Region, St. Dugin 28/12.

**Key words:** LED irradiators, PAR, cucumber, photosynthesis

The correct choice of light conditions for growing plants, taking into account their physiological state, is an important element in obtaining high-quality plant products. It depends on the plants' need for intensity and spectral composition of light. To solve the problem of reducing energy consumption, the application of innovative technologies - low-energy LED irradiators - is becoming topical. They allow to simulate the dynamics of the diurnal variation of the spectral composition of sunlight during plant growing, and also to control the growth and development of plants, accelerating or slowing down individual growth phases. However, it is necessary that in the spectrum of LED luminaires used for growing plants, all areas of visible radiation with a predominance of red and blue rays, as well as a small proportion of ultraviolet and far red light.

The objective of the work was to estimate the intensity of CO<sub>2</sub> gas exchange, the activity of the light stage of photosynthesis in terms of the variable fluorescence of chlorophyll a, growth parameters of plants that were grown for a long time under conditions of complete spectral irradiation in the field of photosynthetically active radiation (PAR) under LED irradiators and DNAT-600 lamps. Cucumber plants (*Cucumis sativus* L., Tristan F1 hybrid) were grown by aeroponics on two isolated shelves, which made it possible to specify the necessary parameters of irradiation: the intensity and spectral composition of the light.

The intensity of leaf photosynthesis was measured using the photosynthetic system LCPro + (ADC BioScientific Ltd., UK). The rate of gas exchange of plant leaves was measured at a light intensity of 304 and 412  $\mu\text{mol}$  of m-2s-1 photons, respectively under LED irradiators and DNAT-600 lamps, i.e. at the intensity of growing plants, and also determined the "potential" gas exchange rate at 1200  $\mu\text{mol}$  of m-2s-1 photons. The rate of photosynthesis versus light intensity was determined in the PHA range from 0 to 1200  $\mu\text{mol}$  m-2s-1 photons at a CO<sub>2</sub> concentration in air of  $420 \pm 22 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ . For this purpose, the level of light intensity was successively increased from 0 to 1200  $\mu\text{mol}$  of m-2s-1. Variable fluorescence was recorded with a PAM fluorimeter (PAM-Junior, Heinz Walz, Germany). Every 4-7 days, the growth parameters were determined: the height of the plants, the number of tiers, the diameter of the root neck.

Analysis of the distribution of irradiation spectra shows that the "red" part of the spectrum in the wave band of 600-700 nm has the highest value for productivity. According to this indicator, the LED fixtures BIO 03-180 exceed the lamps DNAT 600 by 40  $\mu\text{mol}$  m-2s-1. Moreover, the efficiency of the distribution within the "red" part of the BIO 03-180 spectrum is much better than that of the DNAT 600 - the maxima are distributed over a range of 660-680 nm, in contrast to the DNAT 600 - maxima in the 600-610 nm region.

It is shown that a photosynthetic apparatus is formed in cucumber plants under conditions of high irradiation levels (304 and 412  $\mu\text{mol}$  m-2s-1) and temperatures of 25 and 26 ° C, capable of efficiently operating with an increase in the light intensity up to 1200  $\mu\text{mol}$  m-2s-1. This regularity depends more on the temperature (R 0.81) than on the background of illumination (R 0.73), but under medium and low illumination conditions (300  $\mu\text{mol}$  m-2s-1), the assimilation potential of plants is determined by the background illumination (R 0, 95). That is, an increase in the intensity of assimilation light must necessarily be accompanied by an increase in the daily air temperature in crops.

The yield was higher during the initial collection period under DNAT-600 lamps, but subsequently decreased and, as a result, the total yield was lower compared to the LED variants. The received data testify to the possibility of reducing the energy capacity of LED irradiators in comparison with DNAT-600 lamps, which should ensure a reduction in energy consumption by 30-35%.



УДК 615.664.54

## ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА

Урусов А.Е., Бартош А.В., Губайдуллина М.К., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия  
119071, Москва, Ленинский проспект 33  
e-mail: urusov.alexandr@gmail.com

Разработаны и апробированы новые иммунохроматографические схемы анализа, использующие не прямое введение маркера, агрегации наночастиц, изменения геометрии потока на мембранах. На примерах микотоксинов и антибиотиков показано более чем 100-кратное снижение предела обнаружения и рост детектируемого сигнала при сохранении эксплуатационных свойств тест-систем (простоты использования, стабильности при хранении и возможности визуальной оценки результатов).

**Ключевые слова:** иммунохроматография, тест-полоски, реакция антиген-антитело.

Иммунохроматографические методы анализа просты и эффективны в использовании, особенно для контроля сельскохозяйственной продукции, но по чувствительности уступают традиционным иммунохимическим и физико-химическим подходам. Нами предложены новые решения, позволяющие преодолеть это ограничение.

Проведена замена традиционных конъюгатов специфических антител с окрашенной наночастицей на комплекс свободных специфических антител с конъюгатом антивидовые антитела-маркер или стрептавидин-маркер. Результат: повышение чувствительности и сокращение расхода специфических иммунореагентов. Так, предел обнаружения для тест-системы определения зеараленона составляет 50 пг/мл при расходе специфических антител 10 нанограммов на тест.

Применено лазерное травление микрофлюидных каналов на рабочей мембране тест-полоски для изменения скорости и направления движения реагентов. На примере тест-системы на хлорамфеникол показано повышение чувствительности в 5 раз при времени анализа 10 минут.

Предложена новая схема иммунохроматографического анализа, при которой происходит инверсия контрольной и аналитической зон: зона с иммобилизованным антигеном сохраняет окрашивание при любой концентрации антигена в пробе, а интенсивность окрашивания линии с антивидовыми антителами определяется содержанием антигена в пробе. Результат: снижение визуального предела обнаружения. Например, при определении микотоксина дезоксиниваленола наблюдается 100-кратный выигрыш в чувствительности (с 200 до 2 нг/мл).

Разработанные системы обеспечивают полноту выявления антигенов в растительных экстрактах не ниже 90% и позволяют проводить тестирование во внелабораторных условиях, что свидетельствует о перспективности предложенных подходов.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-2075.2017.4).

UDC 615.664.54

## HIGHLY SENSITIVE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST-SYSTEMS FOR AGRICULTURE

Urusov A.E., Bartosh A.V., Gubaidullina M.K., 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 Prospekt 33  
e-mail: urusov.alexandr@gmail.com

New immunochromatographic assay schemes based on indirect introduction of marker, aggregation of nanoparticles, changes in geometry of flow along membranes were developed and tested. Using mycotoxins and antibiotics, a more than 100-fold decrease in the detection limit and an increase in the detectable signal were demonstrated, while the operational properties of the assays were maintained (ease of use, storage stability, and visual evaluation of the results).

**Key words:** immunochromatography, test strips, antigen-antibody reaction.

Immunochromatographic methods are simple and effective in use, but they are inferior in sensitivity to traditional immunochemical and physicochemical approaches. We propose new solutions for agriculture to overcome this limitation.

The traditional conjugates of specific antibodies with a colored nanoparticle were replaced with a complex of free specific antibodies with the conjugate of anti-species antibody – marker or streptavidin – marker. As a result, the sensitivity was increased and the consumption of specific immunoreagents was decreased. Thus, for zearalenone assay the detection limit was 50 pg/ml with the consumption of specific antibodies at 10 nanograms per assay.

The laser etching of microfluidic channels on the working membrane was used to change the speed and direction of the reagents flow. For the assay of chloramphenicol a 5-fold increase in sensitivity was demonstrated with the assay duration reduced to 10 min.

A new scheme of immunochromatographic analysis was proposed in which the control zone and analytical zone are inverted: the zone with immobilized antigen retains coloration at any antigen concentration in the sample, while the intensity of the anti-species antibodies line coloration is determined by the antigen content in the sample. As a result, the visual detection limit was reduced; for mycotoxin deoxynivalenol detection a 100-fold decrease was found (from 200 to 2 ng/ml).

The developed systems ensure the detection of at least 90% of antigens in plant extracts and the possibility of assaying in the non-laboratory conditions, which confirms that the proposed approaches are quite promising.

This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation (МК-2075.2017.4).

УДК 575.224.46; 581.154

## ГЕНЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА КАК ФАКТОР ИНДУЦИРОВАНИЯ МУТАЦИЙ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Боме Н.А.<sup>1</sup>, Королев К.П.<sup>1</sup>, Тетяников Н.В.<sup>1</sup>, Вайсфельд Л.И.<sup>2</sup>, Боме А.Я.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Тюменский государственный университет, Тюмень, 625003, Россия  
Тюмень, ул. Володарского, д. 6., e-mail: botena@mail.ru

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва Россия  
119334 Москва, ул. Косыгина, д. 4.

Получены новые данные об особенностях ответной реакции видов и сортов культурных растений на обработку семян различными концентрациями растворов химических мутагенов. Показан положительный мутационный эффект нового химического мутагена фосфемид на пшенице, ячмене и льне.

**Ключевые слова:** мутагены, фосфемид, хлорофилл, изменчивость, культурные растения, стресс.

На производство растениеводческой продукции влияет множество абиотических и биотических стрессов (засуха, засоление почв, пониженные температуры, болезни растений и др.). Значимость проблемы в северных широтах, что также касается и сельскохозяйственной территории Тюменской области, подтверждается увеличением исследований по влиянию глобальных изменений климата на микробиологические процессы в почве, физиологические и биохимические изменения в растениях, ареал вредителей и возбудителей болезней растений. Следовательно, одной из первоочередных задач является разработка принципиально новых способов получения форм растений, обладающих устойчивостью к воздействию стрессовых факторов окружающей среды. Устойчивость у растений может быть индуцирована с помощью генетически активных веществ, вызывающих положительные мутационные эффекты. Развитие мутационной селекции связано с применением известных химических мутагенов (N-нитрозометилмочевина, N-нитрозоэтилмочевина, этиленмин, демитилсульфат, диэтилсульфат), а также с открытием новых высокоактивных веществ (Моргун и др., 2013; Plant mutation breeding and biotechnology..., 2012). Мутагенный эффект фосфемид на первом этапе изучался нами на модельном объекте *Strepis cappilaris*, в настоящее время - на сортах и гибридных формах пшеницы, ячменя, льна-долгунца в диапазоне концентраций от 0,005% до 0,01% (Боме и др., 2017). Для дифференциации видов и сортов на воздействие мутагена и выявления летальных и оптимальных концентраций растворов, наряду с традиционными популяционными показателями энергии прорастания и всхожести семян, рассчитаны индексы ингибирования роста как соотношение длины корней, побегов, числа зародышевых корней проростков в вариантах при действии мутагена

и в контроле. Лучшее понимание клеточных, молекулярных и биохимических механизмов, определяющих физиологический потенциал семян, связано с идентификацией маркеров, к числу которых относят содержание хлорофилла. В качестве маркера чувствительности генотипа к мутагену в первом поколении (M1) используем содержание хлорофилла в клетках листьев на основе показаний счетчика хлорофилла SPAD 502 (Minolta Camera Co, LTD, Токио, Япония). Реакция на обработку семян культур и сортов мутагеном по показаниям SPAD 502 молодых растений (вегетационный опыт в моделируемых условиях) в большинстве случаев подтверждена на взрослых растениях (полевой опыт в естественных условиях). В вариантах с мутагенной обработкой выявлены изменения морфологических признаков (высота растений, размеры листовой пластинки), строение и окраска соцветий, физиологические особенности роста и развития.

*Литература:*

1. Моргун В.В., Катеринчук А.М., Чугункова Т.В. Использование новых стереоизомеров нитрозоалкилмочевины в селекции озимой пшеницы // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. Т. 15, № 3 (5). С. 1666-1669.
2. Plant mutation breeding and biotechnology /Q.Y. Shu, B.P. Forster, H. Nakagawa (eds). Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria, 2012. 589 p.
3. Боме Н.А., Вайсфельд Л.И., Бабаев Е.В., Боме А.Я., Колоколова Н.Н. Агробиологические признаки яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при обработке семян химическим мутагеном фосфемидом // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52, № 3. С. 570-579.

UDC 57; 60; 63; 631/635

## GENETICALLY ACTIVE SUBSTANCES AS THE FACTOR OF INDUCING MUTATIONS IN AGRICULTURAL PLANTS

**Bome N.A.<sup>1</sup>, Korolev K.P.<sup>1</sup>, Tetyannikov N.V.<sup>1</sup>, Weissfeld L.I.<sup>2</sup>, Bome A.Y.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Tyumen State University, Tyumen, Russia  
625003, Tyumen, 6, Volodarsky St., e-mail%  
bomena@mail.ru

<sup>2</sup> N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia  
119334 Moscow, 4, Kosygina St.

Have been obtained a new data showing of the response of species and varieties of cultivated plants to the treatment of seeds with different concentrations of chemical mutagen solutions. Shown a positive mutational effect of a new chemical mutagen of phosphemidum on wheat, barley and flax.

**Key words:** mutagens, phosphemidum, chlorophyll, variability, cultivated plants, stress.

The cultivation of crop production is affected by a lot of abiotic and biotic stresses (drought, soil salinization, low temperatures, plant diseases, etc.). The importance of the problem in the northern latitudes, as for the agricultural territory of the Tyumen region, is confirmed by an increase of researches on the effect of global climate change on microbiological processes in the soil, physiological and biochemical changes in plants, the pest habitat and plant pathogens. Thus, one of the primary tasks is the development of fundamentally new ways to obtain varieties or forms of plants that are resistant to the impact of stressful environmental factors. Stability of plants can be induced with the help of genetically active substances that cause positive mutational effects. The development of mutational selection is associated with use of known chemical mutagens (N-nitroso-N-methylurea, N-nitroso-N-ethylurea, ethyleneimine, dimethyl sulfate, diethyl sulfate), as well as discovery of new highly active substances (Morgun et al., 2013, Plant mutation breeding and biotechnology..., 2012). The mutagenic effect of phosphemidum was studied by us on the model object *Crepis capillaris* at the first stage; and on varieties and hybrid forms of wheat, barley, and flax fiber at present time in concentration range from 0.005% to 0.01% (Bome et al., 2017). In order to determine the impact of mutagen to species and varieties of plants and to identify lethal and optimal solution concentrations, in addition to the traditional population exponents such as seed germination and growth, have been calculated indices of the growth inhibition as the ratio of the length of roots, shoots, the number of germinal roots of seedlings in variants under the action of a mutagen and in control. The best understanding of cellular, molecular and biochemical mechanisms, which determine the physiological potential of seeds, is associated with the identification of markers, and the chlorophyll content. As a marker of the genotype sensitivity to the mutagen in the first generation (M1), we use the chlorophyll content in the leaf cells based on the indications of the chlorophyll

counter SPAD 502 (Minolta Camera Co., LTD, Tokyo, Japan). The reaction of seeds of crops and varieties to the treatment by a mutagen according to the indications of SPAD 502 on young plants (vegetative experience under simulated conditions) has confirmed in most cases on adult plants (field experience in vivo). In experiments with mutagenic treatment were revealed changes in morphological characters (plants height, leaf plate size), structure and color of inflorescences, physiological features of growth and development.

References:

1. Morgun V.V., Katerynychuk A.M., Chugunkova T.V. Use of new stereoisomers of nitrosoalkyl urea in selection of winter wheat // *News of the Samara Scientific Center of the RAS*. 2013. T. 15, No. 3 (5). - P. 1666-1669.
2. *Plant mutation breeding and biotechnology* /Q.Y. Shu, B.P. Forster, H. Nakagawa (eds). Plant Breeding and Genetics Section, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria, 2012. 589 p.
3. Bome N.A., Weisfeld L.I., Babaev E.V., Bome A.Y., Kolokolova N.N. Agrobiological signs of spring soft wheat (*Triticum aestivum* L.) in process of treatment seeds with chemical mutagen, phosphamide // *Agricultural biology*. 2017. Vol. 52, No. 3. P. 570-579.

УДК 60

## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Симагина П.В., Гришина А.Н., Суясов Н.А., Бондарева Г.М.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия  
123480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20  
e-mail: simagina.polya@yandex.ru

В настоящее время все больше внимания уделяется процессу получения микробной биомассы метанооксиляющих микроорганизмов. Данный биотехнологический процесс осуществляется ассоциацией микроорганизмов, в который помимо штамма-продуцента входят микроорганизмы-спутники и сопутствующая микрофлора.

**Ключевые слова:** метанооксиляющие бактерии, биотехнология, биомасса, ассоциации культур.

В настоящее время в Российской Федерации остро стоит вопрос наращивания темпов развития животноводства и птицеводства, решение которого невозможно без создания полноценной современной кормовой базы. Основная проблема состоит в том, что значительная часть компонентов кормов и сырья для производства кормов импортируется из-за рубежа.

Наиболее эффективным способом устранения проблемы импортозамещения является использование белковой микробной биомассы, полученной путем микробиологического синтеза при использовании различного рода сырья, в том числе и различных отходов [1]. Достоинством микробиологического синтеза белковой биомассы является отсутствие сезонности и требований по климату, стабильность качества продукции, отсутствие необходимости в больших посевных площадях, стабильно высокое качество биомассы, которое отличается высоким содержанием белка и богатым содержанием незаменимых аминокислот, в первую очередь лизином.

Исследовано множество способов синтеза микробного белка с различными видами субстратов и получены достаточно высокие результаты [2, 3]. Один из наиболее перспективных и общепризнанных в мире способов получения белка является способ культивирования на газообразных углеводородах. В качестве субстрата может служить как метан, так и природный газ.

Известно, что большинство биотехнологических процессов, связанных с деятельностью микроорганизмов осуществляются ассоциациями культур. Ассимиляция метана возможна благодаря присутствию такого фермента, как метанмонооксигеназа, характерного для всех метанооксиляющих микроорганизмов. Отличительной особенностью данного фермента является относительно низкая субстратная специфичность, что приводит к накоплению продуктов соокисления [4]. Смешанная культура содержит в себе штамм-продуцент, бактерии-спутники, и сопутствующую микрофлору. Данная микрофлора необходима для переработки продуктов метаболизма штамма-продуцента, что необходимо для устойчивого развития основной культуры в процессе культивирования.

Проведенные исследования с рядом устойчивых сообществ метанооксиляющих микроорганиз-

мов на основе микроорганизмов *Methylococcus capsulatus*, *Methylosinus sporium*, *Methylocystis parvus*, *Methylobacter* sp., *Methylocystis methanolicus*, сформировавшихся в ходе длительного хемостатного культивирования показали, что состав сообщества соответствует вышеуказанной структуре, а именно: целевые микроорганизмы-спутники в количестве 1-3 основных штаммов микроорганизмов, характерных для данного сообщества, сопутствующая микрофлора, которая содержит в себе бактерии-спутники (1-3 штамма) и сопутствующую микрофлору (5-8 штаммов). В отдельных случаях выявляется наличие контаминантной микрофлоры, количество которой может достигать 10 различных штаммов микроорганизмов.

*Литература:*

1. Градова Н. Б. *Микробиологические основы производства кормового белка // Получение и применение кормового микробного белка.* — 1989. — С. 160–177.
2. Е. В. Башашкина, Н. А. Суясов, И. В. Шакир, В. И. Панфилов *Использование отходов масложирового производства в качестве сырья для получения дрожжевой биомассы кормового назначения // Химическая промышленность сегодня.* — 2008. — С. 24–28.
3. Васильев А. В., Шакир И. В., Панфилов В. И. *Получение кормового белкового продукта на основе отходов пищевой промышленности и сельского хозяйства // Актуальная биотехнология.* — 2016. — С. 169–172.
4. Е. С. Бабусенко, Г. И. Эль-Регистан, Н. Б. Градова и др. *Исследование влияния внеклеточных метаболитов на развитие метаноксиляющей культуры *Methylococcus capsulatus* // Прикладная биохимия и микробиология.* — 1992. — Т. 28, № 5. — С. 753–75

UDC 60

## STUDYING THE PROPERTIES OF THE MICROBIAL COMMUNITY OF METHANE OXIDIZING MICROORGANISMS

**Simagina P.V., Grishina A.N., Suyasov N.A., Bondareva G.M.**

*Moscow University of Chemical Technologies of Russia, Moscow, Russia  
123480 Moscow, Geroev Panfilovtsev street, 20.  
e-mail: simagina.polya@yandex.ru*

Nowadays more attention is paid to the process of obtaining microbial biomass of methane oxidizing microorganisms. This biotechnological process is carried out by the association of microorganisms, in addition to the producer strain, there are microorganisms-satellites and a concomitant microflora.

**Key words:** methane oxidizing bacteria, biotechnology, biomass, associations of culture.

At current times, the Russian Federation is keen to increase the rates of livestock and poultry farming, the solution of which is impossible without the creation of a full-fledged modern fodder base. The main problem is that a significant part of the components of feed and feedstock is imported from abroad.

The most effective way to eliminate the problem of import substitution is the use of protein microbial biomass obtained by microbiological synthesis using various kinds of raw materials, including various wastes [1]. The advantage of microbiological synthesis of protein biomass is the lack of seasonal and climate requirements, the stability of product quality, the lack of the need for large areas of crop, the consistently high quality of biomass, which is characterized by high protein content and rich content of essential amino acids, primarily lysine.

A variety of methods for synthesizing a microbial protein with various kinds of substrates have been studied and fairly high results have been obtained [2, 3]. One of the most promising and universally recognized methods of protein production is the method of cultivation on gaseous hydrocarbons. Both methane and natural gas can serve as substrates.

It is known that most of the biotechnological processes, associated with the activity of microorganisms, are carried out by associations of cultures. Assimilation of methane is possible due to the presence of an enzyme such as methane monooxygenase, which is characteristic of all methane oxidizing microorganisms. A distinctive feature of this enzyme is a relatively low substrate specificity, which leads to the accumulation of co-oxidation products [4]. The mixed culture contains a producer strain, bacterial satellites, and a concomitant microflora. This microflora is necessary for processing the metabolic products of the producer strain, which is necessary for the sustainable development of the main culture in the process of cultivation.

Studies with a number of stable communities of methane oxidizing microorganisms based on the microorganisms *Methylococcus capsulatus*, *Methylosinus sporium*, *Methylocystis parvus*, *Methylobacter* sp., *Methylocystis methanolicus*, formed during prolonged chemostat culture showed that the composition of the

community corresponds to the above structure, namely, the target microorganisms-satellites in the number of 1-3 major strains of microorganisms characteristic of this community, a concomitant microflora, which contains the bacterial satellites (1-3 strains), concomitant microflora (5-8 strains). In some cases, the presence of a contaminant microflora is detected, the amount of which can reach 10 different strains of microorganisms.

*References:*

1. Gradova N. B. *Mikrobiologicheskie osnovy proizvodstva kormovogo belka // Poluchenie i primenenie kormovogo mikrobnogo belka.* — 1989. — S. 160–177.
2. E. V. Bashashkina, N. A. Suyasov, I. V. SHakir, V. I. Panfilov *Ispol'zovanie othodov maslozhirovogo proizvodstva v kachestve syr'ya dlya polucheniya drozhzhevoj biomassy kormovogo naznacheniya // Himicheskaya promyshlennost' segodnya.* — 2008. — S. 24–28.
3. Vasil'ev A. V., SHakir I. V., Panfilov V. I. *Poluchenie kormovogo belkovogo produkta na osnove othodov pishchevoj promyshlennosti i sel'skogo hozyajstva // Aktual'naya biotekhnologiya.* — 2016. — S. 169–172.
4. E. S. Babusenko, G. I. EHI'-Registan, N. B. Gradova i dr. *Issledovanie vliyaniya vnekletochnykh metabolitov na razvitie metanokislyayushchej kul'tury methylococcus capsulatus // Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya.* — 1992. — T. 28, № 5. — S. 753–759.

УДК 616.579.67

## ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *CAMPYLOBACTER JEJUNI* К ВОЗДЕЙСТВИЮ БИОЦИДОВ

Стеценко В.В., Быкова И.Б., Ефимочкина Н.Р., Шевелева С.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва, Россия  
109240, Москва, Устьинский проезд, 2/1  
e-mail: stetsenko\_valentina1992@mail.ru

Проведено изучение чувствительности тест-штаммов кампилобактеров и сальмонелл к воздействию биоцидов на основе гипохлорита и надуксусной кислоты (НУК). Результаты исследований по оценке антимикробного действия биоцидов на основе НУК свидетельствуют о необходимости оптимизации режимов контактного охлаждения сырья на птицеперерабатывающих предприятиях и подбора концентраций рабочих растворов дезсредств.

**Ключевые слова:** биоциды, *Campylobacter jejuni*, надуксусная кислота, резистентность.

Влияние неблагоприятных воздействий внешней среды на жизненно важные функции бактериальной клетки происходит на различных регуляторных уровнях, что может сопровождаться появлением индуцированной толерантности микроорганизмов к воздействию тех или иных бактерицидных факторов. В природных условиях, а также при санитарной обработке воды и оборудования толерантность бактерий может формироваться под влиянием различных антибактериальных агентов, в том числе хлора, кислот, щелочей, консервантов, антиоксидантов, бактериофагов, колицинов, акрилатов, ионов металлов [1]. Биоциды широко используются для предотвращения бактериального обсеменения птицепродуктов на предприятиях птицеперерабатывающей промышленности и в клинических условиях [1, 2].

Для оценки эффективности подавления патогенной микрофлоры различными антимикробными препаратами проведено изучение чувствительности тест-штаммов кампилобактеров и сальмонелл (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* и *S.typhimurium*) к воздействию биоцидов на основе гипохлорита и двух видов технологических вспомогательных средств на основе надуксусной кислоты (НУК). Ингибирующее действие дезсредств оценивали по интенсивности роста тест-штаммов в зависимости от концентрации биоцида и плотности бактериальных популяций.

Биоциды на основе НУК (с концентрацией рабочего раствора 0,04%, время экспозиции 25 мин при температуре +20С) полностью подавляли рост тест-штаммов сальмонелл при исходной плотности бактериальных суспензий 109 КОЕ/см<sup>3</sup>. При аналогичных условиях происходило подавление значительного числа бактерий *C.jejuni* - с 1,0x 10<sup>9</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> до 1,0 x10<sup>4-5</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> (средство 1) или до 1,0 x10<sup>6-7</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> (средство 2), однако заданные режимы обработки не обеспечивали полной инактивации кампилобактерий. После обработки хлором у штаммов *S.enteritidis* и *S.typhimurium* регистрировали отсутствие пленкообразования, в то время как у *C.jejuni* наблюдали тенденцию к усилению способности к образованию биопленок.

Результаты проведенных сравнительных исследований по оценке антимикробного действия биоци-

дов на основе НУК свидетельствуют о необходимости оптимизации режимов контактного охлаждения сырья на птицеперерабатывающих предприятиях и подбора концентраций рабочих растворов дезсредств. При регулярной санитарной обработке воды и оборудования с применением биоцидов высока вероятность образования биопленок на поверхностях оборудования и инвентаря, что снижает эффективность режимов обработки, рассчитанных на элиминацию свободных популяций микробных контаминантов, в том числе возбудителей пищевых инфекций. Выжившие в процессе такой обработки патогены могут с водой инфицировать сырье или оборудование на различных стадиях технологического процесса.

Литература:

1. Шевелева С.А., Ефимочкина Н.Р., Козак С.С., Минаева Л.П., Быкова И.Б., Пичугина Т.В., Маркова Ю.М., Короткевич Ю.В. Влияние традиционных технологий охлаждения на профиль патогенных микробных контаминантов мяса птицы отечественного производства // Вопросы питания - 2016 – Т.85, № 2.-С.38-39.
2. Mavri A., Ribič U., Možina S.S. The Biocide and Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*//Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food 2015.P.269-283.

UDC 616.579.67

## STUDY OF THE SENSITIVITY OF CAMPYLOBACTER JEJUNI STRAINS TO THE INFLUENCE OF BIOICIDES

Stetsenko V.V., Bikova I.B., Efimochkina N.R., Sheveleva S. A

Federal State Budgetary Institution of Science Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow, Russia  
109240, Moscow, Ustinsky proezd, 2/14  
e-mail: stetsenko\_valentina1992@mail.ru

The study of the sensitivity of *Campylobacter* and *Salmonella* test strains to the influence of biocides based on hypochlorite and peracetic acid. The results of comparative studies on the evaluation of the antimicrobial effect of biocides based on peracetic acid indicate the need to optimize the regimes of contact cooling of raw materials at poultry processing plants and the selection of concentrations of working solutions of disinfectants.

**Key words:** biocides, *Campylobacter jejuni*, peracetic acid, resistance.

The influence of adverse factors of the external environment on the vital functions of a bacterial cell occurs at various regulatory levels, which may be accompanied by the appearance of induced tolerance of microorganisms to the effects of certain bactericidal factors. In natural conditions, as well as in the sanitary treatment of water and equipment, the tolerance of bacteria can be formed under the influence of various antibacterial agents, including chlorine, acids, alkalis, preservatives, antioxidants, bacteriophages, colicins, acrylates, and metal ions [1]. Biocides are widely used to prevent bacterial contamination in food-processing and/or in clinical environments [1, 2].

The study of the sensitivity of *Campylobacter* and *Salmonella* (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* и *S.typhimurium*) test strains to the influence of biocides based on hypochlorite and two types processing aids based on peracetic acid was carried out to estimate the effectiveness of pathogenic microflora suppression by various antimicrobial agents. The inhibiting effect of disinfectants was estimated by the intensity of growth of test strains depending on the concentration of biocide and the density of bacterial populations.

Biocides based on peracetic acid (with a working solution concentration of 0.04% for peracetic acid, exposure time of 25 min at +20C) completely inhibit growth of *Salmonella* test strains at the initial density of bacterial suspensions of 10<sup>9</sup> cfu / cm<sup>3</sup>. Under similar conditions, a significant number of *C.jejuni* were inhibited from 1.0x10<sup>9</sup> cfu / cm<sup>3</sup> to 1.0x10<sup>4-5</sup> cfu / cm<sup>3</sup> (agent 1) or up to 1.0x10<sup>6-7</sup> cfu / cm<sup>3</sup> (agent 2), however, the given processing conditions did not ensure complete inactivation of test strains. The absence of biofilm formation was recorded after chlorine treatment, in strains of *S.enteritidis* and *S. typhimurium*, while *C.jejuni* observed a tendency to increase the ability to form biofilms.

The results of comparative studies on the evaluation of the antimicrobial effect of biocides based on peracetic acid indicate the need to optimize the regimes of contact cooling of raw materials at poultry processing plants and the selection of concentrations of working solutions of disinfectants. The probability of biofilm formation on the surfaces of equipment and inventory on regular sanitary treatment of water and equipment using biocides is high, which reduces the effectiveness of treatment regimes designed to eliminate free populations of microbial contaminants, including agents of foodborne infections. Surviving in the process of such processing pathogens can infect raw materials or equipment with water at various stages of the technological process.

References:

1. Sheveleva S. A., Efimochkina N. R., Kozak S. S., Minaeva L. P., Bykova I. B., Pichugina T. V., Markova Yu. M., Korotkevich Y. V. *Vlijanie traditsionnyh tehnologij ohlazhdenija na profil' patogennyh mikrobnnyh kontaminantov mjasa ptitsy otechestvennogo proizvodstva //Voprosy pitaniya 2016. Vol. 85. № 2. P.38-39.*
2. Mavri A., Ribič U., Možina S.S. *The Biocide and Antibiotic Resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli //Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food 2015. p.269-283.*

УДК 57.085.23:543.544.5.068.7

## ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК *AJUGA TURKESTANICA*

Харитонов Т.Д.<sup>1</sup>, Титова М.В.<sup>1</sup>, Собољкова Г.И.<sup>1</sup>, Чернобурова Е.И.<sup>2</sup>, Заварзин И.В.<sup>2</sup>, Носов А.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия  
127276, Москва, ул. Ботаническая, 35  
e-mail: Khartimur@mail.ru

<sup>2</sup> Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия  
119991, Москва, Ленинский пр., 47

Показано, что в некоторых линиях каллусных и суспензионных культур клеток *Ajuga turkestanica* содержатся туркестерон и экдистерон, при этом в ряде случаев их содержание может быть сопоставимо с интактным растением.

**Ключевые слова:** *Ajuga turkestanica* (живучка туркестанская), фитоэкдистероид (экдистерон), туркестерон, экстракция, ВЭЖХ.

Фитоэкдистероиды – широко известная группа природных нетоксичных полиоксистероидов (группа полигидроксированных стероидных соединений) [1]. Фитоэкдистероиды обладают высокой биологической активностью и выполняют функции гормонов линьки и метаморфоза насекомых [2]. Научным прорывом стало обнаружение этого класса веществ в растениях [3]. В связи с тем, что экдистероиды широко распространены в мировой флоре, интерес к ним не уменьшается и в настоящее время.

Побеги живучки туркестанской (*Ajuga turkestanica*) применяются в спортивной медицине и косметологии благодаря наличию в них специфического фитоэкдистероида – туркестерона, который по анаболическому эффекту не уступает синтетическим препаратам, не являясь при этом допингом. Туркестерон не токсичен, проявляет тонизирующее действие, стимулирует работоспособность, предохраняет от негативного воздействия различных стрессорных факторов. Живучка туркестанская является источником разнообразных фитоэкдистероидов. В связи с этим большой интерес представляет разработка биотехнологического способа получения экдистероидов с использованием культур клеток *Ajuga turkestanica*.

Целью данного исследования являлось разработка оптимальных условий выращивания культур клеток *Ajuga turkestanica* с максимальным накоплением фитоэкдистероидов, преимущественно туркестерона.

Каллусные и суспензионные культуры были получены в Институте физиологии растений РАН. Культуры *Ajuga turkestanica* выращивали на модифицированной среде Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов.

На первом этапе работы было проведено изучение влияния различных условий экстракции на извлечение экдистероидов из лиофилизированной биомассы культуры клеток *Ajuga turkestanica*. Также была проведена оптимизация методики очистки полученных экстрактов. Очищенные экстракты анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В результате был разработан метод количественного определения содержания экдистероидов в биомассе каллусных и суспензионных культур клеток *Ajuga turkestanica* методом ВЭЖХ. С использованием этого метода проведен скрининг более 50 образцов биомассы культур клеток живучки туркестанской на содержание этих соединений. Показано, что в некоторых линиях каллусных и суспензионных культур клеток *Ajuga turkestanica* содержатся туркестерон и экдистерон, при этом в ряде случаев их содержание может быть сопоставимо с интактным растением.

Литература:

1. Бадулина А.А. *Смолевки секции Otites (Adans) Otth рода Silene L.: интродукция, хемотаксономия, перспективы использования: дис. канд. биол. наук. – Томск, 2014. – С. 16.*
2. Goodwin T.W. *Ecdysteroids. A genetic term. / T.W. Goodwin, D.H.S. Horn, P. Karlson // Nature. 1978. Vol. 272. P. 122.*
3. Ахрем А. А. *Экдистероиды: химия и биологическая активность / А.А. Ахрем, Н.В. Ковганко. – Минск: Наука и техника, 1989. – 327с.*



UDC 57.085.23:543.544.5.068.7

## THE STUDY OF THE CONTENT OF PHYTOECDYSTEROIDS IN THE CULTURE OF CELLS OF AJUGA TURKESTANICA

Kharitonov T.D.<sup>1</sup>, Titova M.V.<sup>1</sup>, Sobolkova G.I.<sup>1</sup>, Chernoburova E.I.<sup>2</sup>, Zavarzin I.V.<sup>2</sup>, Nosov A.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia  
127276, Moscow, 35 Botanicheskaya str.  
e-mail: Khartimur@mail.ru

<sup>2</sup> Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow, Russia  
119991, Moscow, Leninsky Prospect, 47

It is shown that some lines of callus and suspension cell cultures of *Ajuga turkestanica* contain turkesterone and ecdysterone, and in some cases their content can be comparable with the intact plant.

**Key words:** *Ajuga turkestanica*, phytoecdysteroids (ecdysterone), turkesterone, extraction, HPLC.

Phytoecdysteroids is widely known group of natural non-toxic polyoxysteroids (group of polyhydroxylated steroid compounds) [1]. Phytoecdysteroids have a high biological activity and act as hormones of molting and metamorphosis of insects [2]. The scientific breakthrough was the discovery of this class of substances in plants [3]. Due to the fact that ecdysteroids are widespread in the flora world, the interest to them is not decreasing at the present time.

Shoots of *Ajuga turkestanica* are used in sports medicine and cosmetology, due to the presence in them of a specific phytoecdysteroid – turkesterone, which in anabolic effect is not inferior to synthetic drugs, without being doping. Turkesterone is non-toxic, has a tonic effect, stimulates efficiency, protects against the negative effects of various stress factors. *Ajuga turkestanica* is a source of various phytoecdysteroids. In this regard, the development of a biotechnological method for producing of ecdysteroids using *Ajuga turkestanica* cell cultures is of great interest.

This study was focused on building to develop optimal conditions for the cultivation of *Ajuga turkestanica* cell cultures with a maximum accumulation of phytoecdysteroids, mainly turkesterone.

Callus and suspension cultures were obtained at the Institute of Plant Physiology, RAS. *Ajuga turkestanica* crops were grown on modified Murashige and Skoog medium with addition of phytohormones.

In the first phase of work was the study of the influence of different extraction conditions on the extraction of ecdysteroids from lyophilized biomass of *Ajuga turkestanica* cell culture. Was also conducted optimization of purification methods of the resulting extracts. The purified extracts were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

As a result, a method was developed to quantify the content of ecdysteroids in the biomass of callus and suspension of *Ajuga turkestanica* cell cultures by HPLC. Using this method, more than 50 samples of biomass of *Ajuga turkestanica* cell cultures were screened for the content of these compounds. It is shown that some lines of callus and suspension cell cultures of *Ajuga turkestanica* contain turkesterone and ecdysterone, and in some cases their content can be comparable with the intact plant.

### References:

1. Badulina A. A. Smolevki sektsii *Otites* (*Adans*) *Otth* roda *Silene* L.: *introduktsiya, khemotaksonomiya, perspektivy ispolzovaniya* [Catchfly section *Otites* (*Adans*) *Otth* genus *Silene* L.: introduction, chemotaxonomy, prospects of use: Diss. Cand. Biol. Sci.]: Diss. kand. biol. nauk. Tomsk, 2014. – 16 p. (in Russian)
2. Goodwin T.W. Ecdysteroids. A genetic term. / T.W. Goodwin, D.H.S. Horn, P. Karlson // *Nature*. 1978. Vol. 272. 122 p.
3. Akhrem A. A. Ecdysteroidy: *khimiya i biologicheskaya aktivnost`* [Ecdysteroids: chemistry and biological activity] / Akhrem A.A., Kovganko N.V. Minsk: Science & Technique, 1989. 327 p. (in Russian)

УДК 57.013:612.1

## **ЛАЗЕРНАЯ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ СТРЕССЕ**

**Дерюгина А.В.<sup>1</sup>, Самоделкин А.Г.<sup>2</sup>, Иващенко М.Н.<sup>2</sup>, Белов А.А.<sup>2</sup>**

*Нижний Новгород, Россия*

<sup>1</sup> Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ, 603107, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 97, e mail: mi11207@rambler.ru.

Интенсивное развитие животноводства направленное на увеличение продуктивности сопряжено с увеличением стрессовой реакции животных и, как следствие, развитием заболеваний. Актуальной задачей является изучение механизмов стресса для эффективного проведения профилактических мероприятий и возможности коррекции возникающих повреждений при технологическом стрессе у животных. Поскольку мембраны клеток представляют собой мишень для действия стресс-факторов в работе с помощью лазерного микроскопа МИМ 340 выполнена оценка морфологии и резистентности эритроцитов крупного рогатого скота при технологическом стрессе.

Ключевые слова: лазерная модуляционная интерференционная микроскопия, эритроциты, технологический стресс, крупный рогатый скот.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195.

Резервом увеличения продуктивности животных является снижение потерь, наносимых животноводству технологическими стрессами. Учитывая, что эффекторным звеном стресса в условиях целостного организма являются клетки, очевидна значимость экспериментальных исследований, направленных на изучение механизмов реализации стресса на клеточном уровне с возможностью разработки схем и путей коррекции адаптогенеза животных для сохранения их здоровья и высокой продуктивности. Наиболее удачной биологической моделью для изучения динамики нарушений, протекающих в организме при развитии патологии, являются эритроциты. Структурные перестройки которых являются эффективным механизмом как стрессовой, так и строго специфической регуляции самых разнообразных процессов в норме и при патогенезе различной этиологии.

Целью исследования ставился анализ морфо-функционального состояния эритроцитов крупного рогатого скота при технологическом стрессе с использованием лазерной интерференционной микроскопии. Проведение комплексной фазовой микроморфометрии позволило визуализировать модификацию клеток в режиме реального времени, исследовать динамику кооперативных внутриклеточных процессов, получить информацию о процессах, протекающих на мембране, примембранной областях и в цитоплазме эритроцитов. Стрессовое воздействие определило существенное изменение морфологии и размеров эритроцитов. При сравнении фазового портрета эритроцитов, полученных от интактных животных и эритроцитов, полученных от стрессированных животных, были выявлены изменения размеров клеток, топографии и рельефа поверхности мембраны эритроцитов. У стрессированных животных диаметр клеток и толщина в области краев уменьшались, а размер центральной зоны увеличивался, имелась неравномерность распределения уровня гемоглобина в примембранных слоях. Увеличение сферичности клеток сочеталось с интенсивностью стрессового воздействия. На поверхности клеток отмечалось появление шероховатостей и многочисленных пузырьков, что может свидетельствовать о появлении апоптозо-подобных телец. При этом морфологические изменения эритроцитов не сопровождалось монотонным изменением осмотической резистентности клеток.

Используя компьютерные методы цитодиагностики были выявлены новые аспекты функциональной морфологии эритроцитов при стрессе, что может иметь фундаментальное значение для разработки новых методов экспресс-диагностики адаптационного резерва на клеточном уровне.

UDC 57.013:612.1

## LASER INTERFERENCE MICROSCOPY USED FOR THE EXAMINATION OF CATTLE RBC RESISTANCE DURING THE TECHNOLOGICAL STRESS.

Deryugina A.V.<sup>1</sup>, Samodelkin A. G.<sup>2</sup>, Ivashchenko M. N.<sup>2</sup>, Belov A.A.<sup>2</sup>

Nizhny Novgorod, Russia

<sup>1</sup> Institute of biology and Biomedicine Federal state Autonomous educational institution "National research Nizhny Novgorod state University Lobachevsky", 603950, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 23.

<sup>2</sup> "Nizhny Novgorod state agricultural Academy" of the Ministry of agriculture, 603107, Nizhny Novgorod, Gagarin Ave., 97.

The intensive development of animal husbandry having the purpose to increase the productivity is associated with the increase of animal stress reaction. As a consequence it provokes the development of diseases. The study of stress mechanisms for the effective organization of preventive services and for the correction of damages in technological stress of animals is a task of current importance. As the cell membranes are a target for the stress factor influence the examination of cattle RBC resistance and morphology during the technological stress was made in the paper with use of laser microscope MIM 340.

**Key words:** laser modulation interference microscopy, RBC (erythrocytes), technological stress, cattle.

The research was done within the framework of Research № 18-016-00195 of Russian Foundation of Basic Research.

The decrease of losses which the technological stresses cause to the animal husbandry is a reserve for the animal productivity increase. As the cells is an effector link in a complete organism the importance of experiments which would research the mechanisms of stress realization in cell level with the possibility of schemes and animal adaptogenesis correction elaboration is important. It's necessary for animal health and higher productivity maintenance. The erythrocytes is the most convenient biological model for studying of the disturbances dynamic which takes place if any pathology develops in organism. Their structural changes are an effective mechanism of stress as well as of specific regulation of different processes in normal state as well as in any pathology of different etiologies.

The research purpose is to analyses the cattle erythrocytes morphofunctional state during technological stress with use of laser interference microscopy. The complex phase micromorphometry permitted to visualize the cells modification in on-line regime, to study the dynamic of cooperative intracellular processes, to receive the information about the processes which take place in the membrane, in perimembrane area as well as in erythrocytes cytoplasm. The stress influence determined a considerable change of erythrocytes morphology and size. The change of cells size, topography and of the erythrocytes membrane surface relief was discovered by comparing the phase portraits of intact animals with those of stressed animals. The cells diameter and thickness of the stressed animals were lower along the edges, and the central zone size was higher. The hemoglobin level distribution was uneven in perimembrane area. The increase of cells sphericity was combined with the stress influence intensity. The appearance of roughness and of many bubbles was seen in the cells surface. It may be the evidence of apoptotic bodies appearance. At that the erythrocytes morphological change was not accompanied with monotone change of cells osmotic resistance.

New aspects of erythrocytes functional morphology during stress was discovered by using the computer cytodagnosis method. It may play a pivotal role for the elaboration of new methods of adaptive reserve instant diagnosis in cell level.

УДК: 57.579.571.27, ББК: 2.28.4

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАННЕГО ИММУННОГО ОТВЕТА МХА *PHYSCOMITRELLA PATENS* В ОТВЕТ НА ПАТОГЕНЕЗ

Е.Д.Егорова, Н.А.Сухих, С.В.Виноградова

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук; Институт биоинженерии, Российская Федерация, 117312, Москва, пр-т 60-летия Октября, 7/1, sibion.casador@gmail.com, +79653004950

Целью работы является изучение взаимодействия растение-патоген на примере мха *P. patens*. В ответ на инокуляцию его гаметофоров бактериями родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas* синтезируются вторичные метаболиты, участвующие в формировании иммунного ответа, клеточном сигналинге, регуляции проницаемости клеточных мембран и их защите от окислительного стресса

**Ключевые слова:** мох *Physcomitrella patens*, метаболомный профайлинг, метаболические пути, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*

Одной из фундаментальных задач современной биологии является определение молекулярно-генетических механизмов формирования иммунного ответа у высших растений в результате заражения фитопатогенными бактериями. Бриофиты, в том числе мхи, печеночники и роголистники, – первые наземные растения, которые адаптировались к различным абиотическим и биотическим стрессам (Ponce de León and Montesano 2017). Мох *Physcomitrella patens* – новая модельная система для функциональных исследований взаимодействия растений и патогенов. Относительно простое морфологическое строение, высокая скорость роста, простота культивирования и преобладание гаплоидной фазы в сочетании с возможностью создавать нокаут-мутанты делают *P. patens* удобным объектом для изучения воздействия патогенов и индукции защитных механизмов в ответ на патогенез. Кроме того, *P. patens* занимает ключевую позицию между зелеными водорослями и цветковыми растениями, что делает его удобным модельным организмом для сравнительного изучения эволюционных и защитных механизмов.

Ранее было показано, что при инфицировании гаметофоров *P. patens* некротрофными патогенами индуцируются защитные механизмы и увеличивается экспрессия защитных генов: PR-1, PAL, CHS и LOX (Schaefer, 2002; Ponce de León et al., 2007; 2011). Однако работ, посвященных изучению изменений на уровне метаболома растения в ответ на инвазию патогена, достаточно мало, а изучение метаболомного ответа у мхов, инокулированных фитопатогенными бактериями, в сравнении с высшими растениями отсутствуют. Тем не менее, профилирование метаболитов, особенно растений, имеет важное значение для понимания функционирования биологических систем (Fernie et al. 2004). Ранее был собран и аннотирован геном и транскриптом мха (Lang et al., 2005; Zimmer et al., 2013), а также были изучены метаболомные профили протонемы и гаметофоров при различных условиях культивирования (Erxleben et al. 2012). В процессе изучения мхов был проведен ряд исследований по расшифровке транскриптомных (Cuming et al., 2007), протеомных (Wang et al. 2009) и метаболомных (Erxleben, et al., 2012) профилей. Таким образом, целью данной работы является изучение регуляции иммунного ответа мха на метаболомном уровне в ответ на заражение биотрофными фитопатогенными бактериями.

Ранее нами впервые было обнаружено несколько патогенных для *P. patens* штаммов биотрофных фитопатогенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, способных вызывать заболевание растения. Мы подтвердили патогенность штаммов *P. viridiflava*, *P. syringae* и *X. arboricola* для *P. patens* на фенотипическом и цитологическом уровнях в соответствии с постулатами Коха. Гибель клеток подтверждали гистохимическим окрашиванием красителем Эванс синий. Мы обнаружили, что инокулирование гаметофоров мха бактериями *P. viridiflava*, *P. syringae* и *X. arboricola* приводило к механическому укреплению клеточной стенки за счет отложения каллозы и фенольных соединений. Максимальное накопление каллозы было отмечено в клетках мха, зараженных бактерией *P. viridiflava*, на второй день после инокуляции.

Для изучения регуляции иммунного ответа на метаболомном уровне гаметофоры *P. patens* культивировали на агаризованной питательной среде Кнопа в течение 4 недель и инокулировали суспензиями бактерий *P. viridiflava*, *P. syringae* и *X. arboricola*. Сразу после инокуляции, на 2-ой, 5-ый, 10-ый, 17-ый и 30-ый дни после инокуляции выделяли метаболиты и определяли их методом GC-MS. В результате эксперимента было обнаружено 78 метаболитов, из них 65 были аннотированы по базе данных NIST05. Обнаруженные метаболиты ранее детектировали в растениях, в том числе при изучении мхов (Mitra et al. 2017; Erxleben et al. 2012). Из 65 соединений 50 было обнаружено в неинокулированных гаметофорах и 15 – только после инокуляции одной из бактерий. В ответ на биотический стресс у *P. patens* были идентифицированы метаболиты, участвующие в фенилпропаноидном пути: конъюгат циннамата, кофеилхинная и хлорогеновая кислоты, а также интермедиаты биосинтеза лигнина. Кроме того, нами было отмечено преобладание длинноцепочечных жирных кислот (линоленовая, линолевая, арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты) и оксипинов, отсутствующих у цветковых растений и участвующих в защите *P. patens* (Ponce de León and Montesano 2017). На 2-ой и 5-ый дни после инокуляции гаметофоров бактериями *P. syringae*, *P. viridiflava* и особенно *X. arboricola* наблюдали накопление  $\alpha$ -токоферола, который выступает протектором клеточных мембран от окислительного повреждения за счет связывания свободных радикалов в жировом слое клеточных мембран (Munné-Bosch and Alegre 2002). Кроме того,  $\alpha$ -токоферол увеличивает жесткость мембраны и вместе с другими компонентами клеточных мембран участвует в регуляции их проницаемости. В клетках листьев растений он регулирует внутриклеточную сигнализацию, взаимодействуя с ключевыми компонентами сигнальных каскадов и фитогормонами, такими как жасмоновая кислота.

Профилирование метаболитов *P. patens*, инокулированных биотрофными фитопатогенными бактериями родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas*, является первым исследованием метаболитов несосудистых растений, синтезирующихся в ответ на биотический стресс. Таким образом, полученные данные позволяют

сделать вывод об использовании *P. patens* и сосудистыми растениями на стадии раннего иммунного ответа против фитопатогенных бактерий аналогичных защитных реакций.

Литература:

1. Ponce de León I., Montesano M. Adaptation Mechanisms in the Evolution of Moss Defenses to Microbes//*Front. in Plant Sci.* 2017. Vol. 8. № 366.
2. Schaefer D.G. A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*// *Annu. Rev. of plant biol.* 2002. Vol. 53. № 1. P. 477-501.
3. Ponce de León I. et al. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*//*BMC Plant Biology.* 2007. Vol. 7. № 1. P. 52.
4. Ponce de León I. The moss *Physcomitrella patens* as a model system to study interactions between plants and phytopathogenic fungi and oomycetes // *J. of pathogens.* 2011. Vol. 2011. P. 1-10.
5. Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology//*Nature rev. Mol. cell biol.* Vol. 5. № 9. P. 763.
6. Lang D., Eisinger J., Reski R., Rensing S.A. Representation and high-quality annotation of the *Physcomitrella patens* transcriptome demonstrates a high proportion of proteins involved in metabolism in mosses//*P. Biol.* 2005. Vol. 7. № 3. P. 238-250.
7. Zimmer A.D. et al. Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions//*BMC gen.* 2013. Vol. 14. № 1. P. 498.
8. Erxleben A., Gessler A., Vervliet-Scheebaum M., Reski R. Metabolite profiling of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary conservation of osmoprotective substances//*P. cell rep.* 2012. Vol. 31. № 2. P. 427-436.
9. Cumming A.C., Cho S.H., Kamisugi Y., Graham, H., Quatrano R.S. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*//*New Phytol.* 2007. Vol. 176. № 2. P. 275-287.
10. Wang X.Q. et al. Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy//*P. physiol.* 2009. Vol. 149. № 4. P. 1739-1750.
11. Mitra S., Burger B.V., Poddar-Sarkar M. Comparison of headspace-oxylipin-volatiles of some Eastern Himalayan mosses extracted by sample enrichment probe and analysed by gas chromatography-mass//*Protoplasma.* 2017. Vol. 254, № 2. P. 1115-1126.
12. Munné-Bosch S. Alegre L. The function of tocopherols and tocotrienols in plants//*Critical Reviews in Plant Sciences.* 2002. Vol. 21. № 1. P. 31-57.

**Финансирование:** Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 18-34-00822 на базе Экспериментальной установки искусственного климата (регистрационный номер УНУ U-73547).

UDC 57.579.571.27, BBC 2.28.4

## METABOLIC REGULATION OF THE EARLY IMMUNE RESPONSE OF THE MOSS *PHYSCOMITRELLA PATENS* TO PATHOGENESIS

E.Egorova, N.Sukhikh, S.Vinogradova

Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences»; Institute of Bioengineering, Russia, 117312, Moscow, 60 let Oktjabrja pr-t, 7/1

The aim of this work is to study the interaction between plant and pathogen, for example, the moss *P. patens*. In response to the inoculation bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas* gametophores of *P. patens* are synthesized secondary metabolites involved in the formation of the immune response, cellular signaling, regulation of cell membrane permeability and protection against oxidative stress

**Key words:** moss *Physcomitrella patens*, metabolome profiling, metabolic pathways, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*

The determination of molecular and genetic formation of immune responses in higher plants infected with phytopathogenic bacteria is the one of the fundamental problem of modern biology. Bryophytes, non-vascular plants including mosses, liverworts, and hornworts are early evolutionary clades, which were among the first plants that colonized land and adapted to various abiotic and biotic stresses (Ponce de León and Montesano 2017). The moss *Physcomitrella patens* is a new model system for functional studies of the interaction between plants and pathogens. The ability to create gene knockouts and sitespecific mutations in any gene, coupled with other features, such as dominance of the haploid phase, simple morphological organization and ease of cultivation and propagation, allow *P. patens*

to be a convenient object for studying pathogens and induction of defense mechanisms. In addition, *P. patens* occupies a key position between the green algae and flowering plants, making it a convenient model organism for comparative studies of evolutionary and protective mechanisms.

Previously it was shown that in infected gametophores of *P. patens* by necrotrophic pathogens are induced defense mechanisms and increased expression of defense genes, such as PR-1, PAL, CHS and LOX (Schaefer,

2002; Ponce de León et al., 2007; 2011). However, there are few studies devoted to the analysis of plant's metabolomic changes in response to invasion of pathogen, and researches of the metabolomic response in the moss inoculated with phytopathogenic bacteria, in comparison with higher plants do not exist. Nevertheless, the profiling of metabolites, especially in plants, is important for understanding the functioning of biological systems (Fernie et al. 2004). Previously it was assembled and annotated the genome and transcriptome of the moss (Lang et al., 2005; Zimmer et al., 2013), and were examined metabolomic profiles of gametophores and protonema under various conditions of cultivation (Erxleben et al. 2012). A number of studies on the determination of transcript (Cuming et al., 2007), proteomic (Wang et al. 2009) and metabolomic (Erxleben, et al., 2012) profiles was undertaken during the study of mosses. Thus, the aim of this work is to study the regulation of the immune response of the moss on the metabolomic level during the infection of biotrophic phytopathogenic bacteria.

Previously, for the first time ever we detected several pathogenic to *P. patens* strains of the biotrophic phytopathogenic *Pseudomonas* and *Xanthomonas* that can cause plant diseases. We confirmed the pathogenicity of strains of *P. viridiflava*, *P. syringae* and *X. arboricola* for *P. patens* on the phenotypic and cytological levels in accordance with Koch's postulates. Cell death was confirmed by histochemical staining in Evans blue. We found that the inoculation *P. patens* gametophores of bacteria *P. viridiflava*, *P. syringae* and *X. arboricola* leads to mechanical cell wall reinforcement and to callose and phenolic compounds deposition. The most callose accumulation was observed in the cells of the moss, which were infected *P. viridiflava* on the second day after inoculation.

To study the regulation of the immune response at the metabolomic level *P. patens* gametophores were cultivated on agar nutrient Knop's medium for 4 weeks and inoculated with suspensions of bacteria *P. viridiflava*, *P. syringae* and *X. arboricola*. Immediately after inoculation, the 2nd, 5th, 10th, 17th, and 30th days after inoculation metabolites were isolated and determined by GC-MS. As a result, 78 metabolites were discovered, of which 65 were annotated on the database NIST05. Previously identified metabolites were detected in plants including the mosses (Mitra et al. 2017; Erxleben et al. 2012). Of the 65 compounds 50 were detected in not inoculated gametophores and 15 after inoculation only one of the bacteria. In response to biotic stress in *P. patens* were identified metabolites involved in phenylpropanoid way, such as cinnamate conjugate, caffeoylquinic and chlorogenic acids and intermediates of the biosynthesis of lignin. In addition, we noted the domination of long-chain fatty acids (linolenic, linoleic, arachidonic and eicosapentaenoic acid) and oxylipins, which are absent in flowering plants and involved in *P. patens* protection (Ponce de León and Montesano 2017). On the 2nd and 5th days after inoculation in gametophores inoculated with bacteria *P. syringae*, *P. viridiflava* and especially *X. arboricola* was observed the accumulation of  $\alpha$ -tocopherol, which is a protector of cell membranes against oxidative damage by binding free radicals in the fatty layer of cell membranes (Munné-Bosch and Alegre 2002). In addition,  $\alpha$ -tocopherol increases membrane rigidity and with other components of cell membranes involved in the regulation of their permeability. In the plant's leaves cells it regulates intracellular signaling by interacting with key components of signaling cascades and phytohormones, such as jasmonic acid.

The metabolite profiling of *P. patens* inoculated with the biotrophic phytopathogenic bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas* is the first study of non-vascular plant's metabolites synthesized in response to biotic stress. Thus, the obtained data allow to draw a conclusion about the usage of *P. patens* and vascular plants the similar defense reactions in the early stages of an immune response against phytopathogenic bacteria.

#### References:

1. Ponce de León I., Montesano M. Adaptation Mechanisms in the Evolution of Moss Defenses to Microbes// *Front. in Plant Sci.* 2017. Vol. 8. № 366.
2. Schaefer D.G. A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*// *Annu. Rev. of plant biol.* 2002. Vol. 53. № 1. P. 477-501.
3. Ponce de León I. et al. *Erwinia carotovora* elicitors and *Botrytis cinerea* activate defense responses in *Physcomitrella patens*// *BMC Plant Biology.* 2007. Vol. 7. № 1. P. 52.
4. Ponce de León I. The moss *Physcomitrella patens* as a model system to study interactions between plants and phytopathogenic fungi and oomycetes // *J. of pathogens.* 2011. Vol. 2011.
5. Fernie A.R., Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L. Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology// *Nature rev. Mol. cell biol.* Vol. 5. № 9. P. 763.
6. Lang D., Eisinger J., Reski R., Rensing S.A. Representation and high-quality annotation of the *Physcomitrella patens* transcriptome demonstrates a high proportion of proteins involved in metabolism in mosses// *P. Biol.* 2005. Vol. 7. № 3. P. 238-250.
7. Zimmer A.D. et al. Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions// *BMC gen.* 2013. Vol. 14. № 1. P. 498.
8. Erxleben A., Gessler A., Vervliet-Scheebaum M., Reski R. Metabolite profiling of the moss *Physcomitrella patens* reveals evolutionary conservation of osmoprotective substances// *P. cell rep.* 2012. Vol. 31. № 2. P. 427-436.
9. Cuming A.C., Cho S.H., Kamisugi Y., Graham, H., Quatrano R.S. Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid

and osmotic, salt, and drought stress in the moss, *Physcomitrella patens*//*New Phytol.* 2007. Vol. 176. № 2. P. 275-287. 10. Wang X.Q. et al. Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy//*P. physiol.* 2009. Vol. 149. № 4. P. 1739-1750 11. Mitra S., Burger B.V., Poddar-Sarkar M. Comparison of headspace-oxylipin-volatilomes of some Eastern Himalayan mosses extracted by sample enrichment probe and analysed by gas chromatography-mass//*Protoplasma.* 2017. Vol. 254, № 2. P. 1115-1126. 12. Munné-Bosch S. Alegre L. The function of tocopherols and tocotrienols in plants//*Critical Reviews in Plant Sciences.* 2002. Vol. 21. № 1. P. 31-57.

**Grant:** The reported study was funded by RFBR according to the research project 18-34-00822. This work was performed using the experimental climate control facility U-73547.

УДК 579.64:57.088

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАСПОРТИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ БИОПРЕПАРАТОВ – СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Зайцев Г.А.<sup>1</sup>, Сафронова В.И.<sup>2</sup>, Сазонова А.Л.<sup>2</sup>, Жилинская Н.Т.<sup>1,3</sup>, Базарнова Ю.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия, 194021, Санкт-Петербург, Новороссийская ул., д. 50.

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, г. Санкт-Петербург-Пушкин, Россия, 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, Подбельского ш., д. 3.

<sup>3</sup> НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, г. Санкт-Петербург, Россия, 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68.

e-mail: jilinskie@mail.ru

Показана перспективность применения метода AFLP–фингерпринтинга для молекулярно-генетической паспортизации коммерческих производственных штаммов клубеньковых бактерий, повышающих урожайность зернобобовых культур, и используемых для производства биопрепаратов – стимуляторов роста сельскохозяйственных растений.

**Ключевые слова:** клубеньковые бактерии, молекулярно-генетическая паспортизация микроорганизмов, метод AFLP-фингерпринтинга, биопрепараты.

Одна из важнейших проблем сельского хозяйства – увеличение производства растительного белка для питания людей и нужд животноводства. Наибольшее количество растительного белка содержится в зернобобовых культурах. Однако вопросы рационального использования минеральных удобрений до конца не выяснены. Актуальным являются исследования в области поиска биологических стимуляторов роста и повышения урожайности бобовых культур. Клубеньковые бактерии усиливают азотфиксирующие свойства сельскохозяйственных растений и применяются в производстве микробных биопрепаратов, предназначенных для предпосевной инокуляции семян зернобобовых культур. AFLP-фингерпринтинг является наиболее перспективным методом молекулярно-генетической паспортизации микроорганизмов [1].

Целью исследовательской работы было получение индивидуальных генетических паспортов четырех коммерческих производственных штаммов клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*, находящихся в условиях низкотемпературного депонирования в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии.

На рисунке 1 представлен набор точных размеров фрагментов ДНК для каждого штамма «клубеньков», который генерируется в результате AFLP [2].

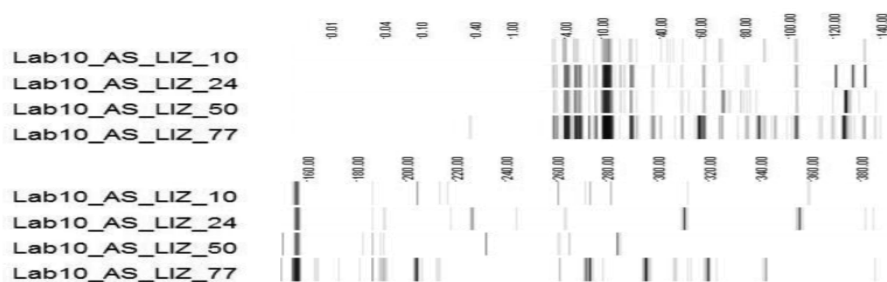


Рис. 1 – Результат анализа AFLP-профилей штаммов *Rhizobium leguminosarum* и *Sinorhizobium meliloti*:  
Lab10\_AS\_LIZ\_10 - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM0610 (для инокуляции вики).  
Lab10\_AS\_LIZ\_24 - *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* RCAM2624 (для инокуляции фасоли).  
Lab10\_AS\_LIZ\_50 - *Sinorhizobium meliloti* RCAM1750 (для инокуляции люцерны).  
Lab10\_AS\_LIZ\_77 - *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* RCAM1077 (для инокуляции гороха).

Показано, что метод генетической паспортизации микроорганизмов рекомендовано использовать для мониторинга фенотипических и генотипических изменений штаммов при культивировании и хранении микроорганизмов сельскохозяйственного назначения, при производстве широкого спектра биотехнологических продуктов: биостимуляторов роста сельскохозяйственных культур, микробов-антагонистов и антибиотиков для защиты растений, аминокислот, ферментов, витаминов, медицинских препаратов, органических кислот [3].

#### Литература:

1. Сафронова В.И., Андронов Е.Е. Чижевская Е.П. Разработка методики молекулярно-генетической паспортизации штаммов сельскохозяйственных микроорганизмов с помощью AFLP-фингерпринтинга //Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 6. – С. 116-121.
2. Зайцев Г.А., Жилинская Н.Т., Сафронова В.И., Сазанова А.Л. Получение генетических паспортов производственных штаммов клубеньковых бактерий, используемых для повышения урожайности бобовых культур, методом AFLP//Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием, 13-19 ноября 2017. Высшая школа биотехнологии и пищевых технологий.- СПб.: Изд-во Политехн.ун-та, 2017.- С. 24-29.
3. Шарова Н.Ю., Сафронова В.И. Генетическая паспортизация штамма *Aspergillus niger* Л-4 – промышленного продуцента лимонной кислоты с помощью геномного AFLP-фингерпринтинга //Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т.51, № 2. – С. 204-2012.

UDC 579.64:57.088

## MOLECULAR-GENETIC CERTIFICATION OF COMMERCIAL MICROORGANISM STRAINS USED IN BIOLOGICALS AS AN AGRICULTURAL CROP GROWTH STIMULATOR

Zaycev G.A.<sup>1</sup>, Safronova V.I.<sup>2</sup>, Sazonova A.L.<sup>2</sup>, Zhilinskaia N.T.<sup>1,3</sup>, Bazarnova I.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Graduate School of Biotechnology and Food Science, St. Petersburg, Russia, 194021, St. Petersburg, Novorossiyskaya str., 48.

<sup>2</sup> All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, St.Petersburg, Russia, 196608, St.Petersburg - Pushkin, Podbelsky sh., 3.

<sup>3</sup> N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St.Petersburg, Russia, 197758, St.Petersburg, Pesochnyi, Leningradskaya str., 68.  
e-mail: jilinskie@mail.ru

It's shown the importance of AFLP–fingerprinting method for molecular-genetic certification of commercial nodule bacteria strains used in biologicals as the bean plants growth stimulator.

**Key words:** nodule bacteria, molecular-genotypic certification of microorganisms, AFLP-fingerprinting, biologicals

The increasing of plant protein production for human and farm animal nutrition is one of the main agriculture



problems. Legums contain the highest amount of plant protein. The question of rational mineral fertilizer usage is still not solved. The search of new biological growth stimulators for legumes yield increasing remains relevant.

Nodule bacteria increase nitrogen fixation properties of agricultural plants. Thus bacteria are used in the production of microbial biologicals for presowing inoculation of legume seeds. AFLP- fingerprinting is the most promising method of microorganism molecular-genetic certification [1].

The aim of the work was to obtain individual genotypic certification of four nodule bacteria strains related to the genera Rhizobium. All strains were deposited under low temperature in the Russian collection of agricultural microorganisms (Russian Agricultural Academy).

Figure 1 presents a set of exact sizes of DNA fragments for each nodule bacteria strain generated by AFLP [2].

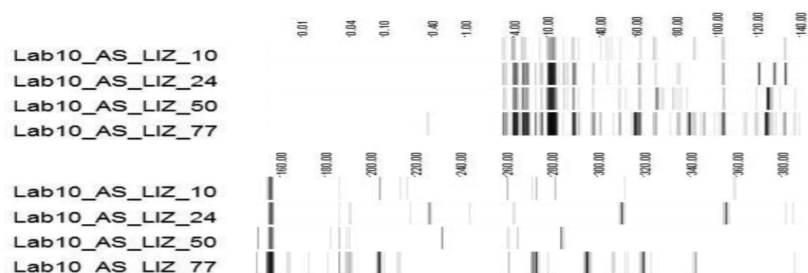


Fig.1. The results of AFLP strain profile analysis of Rhizobium leguminosarum and Sinorhizobium meliloti:

Lab10\_AS\_LIZ\_10 - Rhizobium leguminosarum bv. viciae RCAM0610 (for viki inoculation).

Lab10\_AS\_LIZ\_24 - Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli RCAM2624 (for beans inoculation).

Lab10\_AS\_LIZ\_50 - Sinorhizobium meliloti RCAM1750 (for lucerne inoculation).

Lab10\_AS\_LIZ\_77 - Rhizobium leguminosarum bv. viciae RCAM1077 (for pease inoculation).

It's shown that the AFLP-fingerprinting method has a high specificity, resolution and reproducibility of results. This method can be used to obtain individual microorganism genetic passports in order to protect the copyright of the commercial strains, monitor the phenotypic and genotypic changes of strains during cultivation and storage, and in various areas of biotechnological product industry: crop grow biostimulators, microbes-antagonists and antibiotics for plant protection, amino acids, enzymes, vitamins, pharmaceuticals, organic acids [3].

#### References:

1. Safronova V.I., Chizhevskaya E.P., Andronov E.E. Optimization of the AFLP-fingerprinting method for a molecular-genetic certification of agricultural microorganisms //Agricultural biology (Sel'skokhozyaistvennaya biologiya).- 2012.- No 6. – P. 116-121.
2. Zaycev G.A., Zhilinskaia N.T., Safronova V.I., Sazonova A.L. Obtaining the genetic passports of nodule bacteria industrial strains used for legume yield increasing by ALFP-fingerprinting// Science week of SPbPU: proceedings of conference with international participation, November 13-19, 2017. Graduate School of Biotechnology and Food Science. – SPb.: Publishing house of Polytechnical University, 2017.- P.24-29.
3. Sharova N.Yu., Safronova V.I. ALFP-fingerprinting for pasportization of Aspergillus niger L-4, the citric acid commercial producer //Agricultural biology (Sel'skokhozyaistvennaya biologiya).- 2016.- Vol.51, No 2. – P. 204 - 212.

## НОВЫЕ ГОМОЛОГИ NB-LRR ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОФТОРОЗУ У СЛОЖНЫХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ КАРТОФЕЛЯ

Фадина О.А.<sup>1</sup>, Бекетова М.П.<sup>1</sup>, Кузнецова М.А.<sup>2</sup>, Рогозина Е.В.<sup>3</sup>, Хавкин Э.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия; e-mail: fadinaokcaha@gmail.com

<sup>2</sup> ФГБНУ ВНИИ фитопатологии, Большие Вяземы, Московская обл., Россия

<sup>3</sup> ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

Выявлены новые гомологи NB-LRR генов устойчивости к фитофторозу у сложных межвидовых гибридов картофеля.

**Ключевые слова:** картофель, гены, гомологи

Миграция и быстрая эволюция возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) приводят к быстрой потере устойчивости коммерческих сортов картофеля. Устойчивому картофелеводству нужны сорта, несущие новые гены, обеспечивающие долговременную устойчивость. Их источником являются дикорастущие сородичи картофеля (*Solanum* L. секция *Petota*), которые ранее не вовлекались в селекцию картофеля. Мы исследуем межвидовые гибриды картофеля, несущие генетический материал нескольких дикорастущих видов *Solanum*, включая такой малоизученный вид как *S. alandiae* Card. Скрининг гибридов с помощью SCAR маркеров семи NB-LRR генов устойчивости к фитофторозу (R1, R2 = Rpi-blb3, R3a, R3b, Rpi-blb1 = Rpi-sto1, Rpi-blb2, Rpi-vnt1) выявил гомологи уже известных генов у видов, систематически далеко отстоящих от видов, у которых эти виды были впервые обнаружены. Кроме того, исследованные гибриды, по всей видимости, содержат еще не идентифицированные гены устойчивости, для которых пока отсутствуют маркеры, или гомологи известных генов, которые не распознаются маркерами вследствие значительных изменений в строении.

Работа выполнена в рамках Госзадания 0574-2018-0010 (№ госрегистрации AAAA-A17-117090540058-4).

## LATE BLIGHT RESISTANCE GENES IN COMPLEX INTERSPECIFIC POTATO HYBRIDS

Oksana A. Fadina <sup>1</sup>, Mariya P. Beketova <sup>1</sup>, Mariya A. Kuznetsova <sup>2</sup>, Elena V. Rogozina <sup>3</sup>, Emil E. Khavkin <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia; e-mail: fadinaokcaha@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Phytopathology, Bol'shiye Vyazemy, Moscow region, Russia

<sup>3</sup> N.I. Vavilov Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia

New blight resistance genes in complex interspecific potato hybrid has revealed.

**Keywords:** potato, genes, homologies

Migration and rapid evolution of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary) lead to rapid loss of resistance of commercial potato varieties. Sustainable potato cultivation needs varieties bearing new genes that ensure long-term sustainability. Their source is wild relatives of potatoes (*Solanum* L. section *Petota*), which had not previously been involved in the selection of potatoes. We are investigating the interspecies potato hybrids carrying the genetic material of several wild species of *Solanum*, including such a poorly studied species as the *S. alandiae* Card. Screening of hybrids using SCAR markers of seven late blight resistance genes (R1, R2 = Rpi-blb3, R3a, R3b, Rpi-blb1 = Rpi-sto1, Rpi-blb2, Rpi-vnt1) revealed homologies of already known genes in species, systematically far from the species in which these species were first discovered. In addition, the hybrids studied appear to contain still unidentified resistance genes for which there are as yet no markers or homologies of known genes that are not recognized by markers due to significant changes in structure. The study was supported by State Procurement 0574-2018-0010 (State Registration No. AAAA-A17-117090540058-4).

УДК 581.132

## НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИСПОЛЬЗОВАНИИ СВЕТОДИОДНЫХ ОБЛУЧАТЕЛЕЙ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В РАСТЕНИЯХ

Мартирисян Ю.Ц.<sup>1,3</sup>, Кособрюхов А.А.<sup>1,2</sup>, Мартирисян В.В.<sup>1</sup>, Мартирисян Л. Ю.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии; Москва, ул. Тимирязевская, 42.

<sup>2</sup> ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, Московской обл.

<sup>3</sup> ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4

e-mail: yumart@yandex.ru

Изменение светового режима облучения растений в течение фотопериода позволяет эффективно влиять на активность и соотношение ряда метаболических процессов.

**Ключевые слова:** светодиодные облучатели, ФАР, фотосинтез

Исследование влияния различных спектральных источников облучения на растения актуально в связи с их различным действием на метаболические процессы. При постановке эксперимента мы моделировали соотношение красного (КС) и синего (СС) света на фоне полного спектра в соответствии с естественными условиями в различные периоды светового дня, а также возможные динамические процессы при изменении соотношения КС/СС в течение дня. Проведена оценка действия разных светодиодных режимов облучения на функциональные характеристики фотосинтетического аппарата растений картофеля, длительно выращиваемых в условиях полного спектрального облучения в области фотосинтетически активной радиации (ФАР) с преобладающим синим (ФАР+СС) или красным облучением (ФАР+КС). Оценена динамика переходных процессов при переносе растений с ФАР+КС на ФАР+СС или с ФАР+СС на ФАР+КС облучение, что моделирует дневной ход солнечной радиации. Выявленные особенности действия разных участков спектра на энергетические процессы фотосинтетического аппарата и растение в целом, позволяют направленно изменять спектральный режим при выращивании растений с целью повышения их продуктивности и выхода биологически активных веществ.

UDC 581.132

## NEW APPROACHES IN THE USE OF LED IN THE STUDY OF PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL PROCESSES IN PLANTS

Martirosyan Yu.C.<sup>1,3</sup>, Kosobryukhov A.A.<sup>1,2</sup> Martirosyan V.V.<sup>1</sup>, Martirosyan I.Yu.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> GNU VNII Agricultural Biotechnology; Moscow, Timiryazevskaya, 42.

<sup>2</sup> FGBUN Institute of Fundamental Problems of Biology, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region.

<sup>3</sup> N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS (IBCP RAS)

e-mail: yumart@yandex.ru

The change in the light regime of plant irradiation during the photoperiod makes it possible to effectively influence the activity and ratio of metabolic processes.

**Key words:** LED irradiators, PHAs, photosynthesis

Investigation of the influence of various spectral sources on plants is relevant in connection with their different effects on metabolic processes in plants. In setting up the experiment, We simulated the ratio of red (RL) and blue (BL) light against the full spectrum in accordance with natural conditions at different times of daylight, as well as possible dynamic processes with a change in the ratio of RL/BL during the day. The effect of different LED irradiation regimes on the functional characteristics of the photosynthetic apparatus of potato plants, grown for a long time under conditions of complete spectral irradiation in the region of photosynthetic photon flux (PPF) with predominant blue (PPF+BL) or red irradiation (PPF +RL). The dynamics of transient processes during transfer of plants from PhAR + CS to PHA + CC or with PHA + CC on PHA + CS irradiation is estimated, which simulates the daily course of solar radiation. The revealed peculiarities of the action of different spectral regions on the energy processes of the photosynthetic apparatus and the plant as a whole make it possible to directly change the spectral regime when growing plants in order to increase their productivity and yield biologically active substances.

УДК 579.852.11

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

Питайкина А. В., Яценко Е. С., Ильина Е. Г., Ширманов М. В., Евдокимов И. Ю.

Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия

656049, Барнаул, пр. Ленина, 61

e-mail: mlprx@mail.ru

Получена питательная среда для культивирования бактерий *Bacillus subtilis*, содержащая пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, сульфат аммония и дистиллированную воду при заданном соотношении компонентов. Использование сульфата аммония в качестве стимулятора роста позволяет повысить количество микроорганизмов в процессе культивирования.

**Ключевые слова:** питательная среда, сульфат аммония, стимулятор роста, *Bacillus subtilis*.

Для получения полноценной питательной среды необходимо, тщательно подбирать компонентный состав [1], часть которого составляют неорганические соли. Они используются в питательных средах как дополнительный источник N, P, O, S, H. Микроорганизмы лучше усваивают азот в восстановленной форме, остальные элементы – в окисленной форме.

Для оптимизации питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, были выбраны следующие неорганические соли: сульфат аммония –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; гидрофосфат аммония –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; дигидрофосфат аммония –  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , фосфат аммония  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ .

Питательная среда, готовится при следующем соотношении компонентов (г/л): пептон ферментативный – 15, дрожжевой экстракт – 5, натрий хлористый – 5, неорганическая соль в количествах – 0.25; 0.5; 0.75; 1.00; 1.25, остальное – дистиллированная вода (в плотную среду добавляется агар – 18). Значение pH 7.0–7.2. Стерилизация при 1.1 атм. в течение 40 мин. В колбу Эрленмейера объемом 50 мл, содержащую жидкую питательную среду, вносили 5 г спор штамм *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079, культивирование в колбах в шейкер-инкубаторе «Innova 44» при 250 об/мин (эксцентриситет 5 см) и температуре 37 °С в течение 24 часов. Для оценки количества микроорганизмов использовали стандартный метод десятикратных разведений, с высевом в стерильных условиях в чашки Петри на твердую питательную среду. После чего, чашки с посевами инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. В качестве контрольной пробы проводилось культивирование на средах без добавления солей. Для достоверности все опыты были проведены в семикратной повторности.

Таблица 1. Результаты культивирования *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 в среде, содержащей различные соли

№ пробы	Концентрация соли в пробе, г/л	Количество микроорганизмов в среде с добавлением сульфата аммония, г/л КОЕ/г-10-12	Количество микроорганизмов в среде с добавлением гидрофосфата аммония, г/л КОЕ/г-10-12	Количество микроорганизмов в среде с добавлением дигидрофосфата аммония, г/л КОЕ/г-10-12	Количество микроорганизмов в среде с добавлением фосфата аммония, г/л КОЕ/г-10-12
1	0,25	210±10	221±10	202±10	209±10
2	0,50	207±10	205±10	219±20	212±10
3	0,75	224±10	204±10	240±10	227±20
4	1,00	268±10	203±10	213±10	235±10
5	1,25	221±10	208±10	217±10	265±10
6	0	188±10	188±10	188±10	188±10

Таким образом, из представленных данных видно, что внесение в питательную среду солей: сульфата аммония – 1 г/л; дигидрофосфата аммония – 0.75 г/л, фосфата аммония – 1.25 г/л, способствует увеличению количества *Bacillus subtilis* ВКПМ В-12079 в процессе культивирования (табл. 1).

При одновременном добавлении в питательную среду всех солей в оптимальных для каждой соли концентрациях, наблюдалось подавление роста микроорганизмов.

*Литература:*

1. White A., Handler P., Smith E. L. *Principles of biochemistry*. Baltimore: The Johns Hopkins University School of Medicine, 1974. – 1051 p.

UDC 579.852.11

## OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF BACILLUS SUBTILIS BACTERIA

Pitaikina A. V., Yatsenko E. S., Ilyina E. G., Shirmanov M. V., Evdokimov I. Yu.  
Altai State University, Barnaul, Russia  
656049, Barnaul, Lenin Ave., 61  
e-mail: mlprx@mail.ru

We obtained a nutrient medium for the cultivation of bacteria *Bacillus subtilis*, which contains peptone enzymatic, yeast extract, sodium chloride, ammonium sulfate and distilled water at a given ratio of components. The use of ammonium sulfate as a growth promoter allows increasing the number of microorganisms in the process of cultivation.

**Key words:** nutrient medium, ammonium sulfate, growth stimulant, *Bacillus subtilis*.

To obtain a complete nutrient medium, it is necessary carefully select the component composition [1], part of which is inorganic salts. They used in nutrient medium as an additional source of N, P, O, S, H. Microorganisms had better assimilate nitrogen in a reduced form, and the remaining elements are metabolized in an oxidized form.

To optimize the culture medium for the cultivation of *Bacillus subtilis* VKPM B-12079, the following inorganic salts were chosen: ammonium sulfate –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; ammonium hydro phosphate –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; ammonium dihydrogen phosphate –  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , ammonium phosphate  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ .

Nutrient medium, prepare with the following ratio of components (g/l): peptone enzymatic – 15, yeast extract – 5, sodium chloride – 5, inorganic salt in amounts – 0.25; 0.5; 0.75; 1.00; 1.25, the rest is distilled water (agar – 18 is added to the dense medium). The pH value is 7.0–7.2. Sterilization at 1.1 atm. within 40 minutes. In a 50 ml Erlenmeyer flask containing a liquid nutrient medium, 5 g spores of *Bacillus subtilis* strain VKPM B-12079 were added, cultured in flasks in an Innova 44 shaker incubator at 250 rpm (eccentricity 5 cm) and 37 °C in within 24 hours. To estimate the number of microorganisms, a standard method of tenfold dilutions used, seeded under sterile conditions into Petri dishes on a solid nutrient medium. After that, the plates with crops incubated at 37 °C for 24 hours. As a control sample, cultivation carried out on medium without the addition of salts. For reliability, all experiments carried out in a sevenfold repetition.

Table 1. Results of cultivation of *Bacillus subtilis* VKPM B-12079 in a medium containing various salts.

Sample No.	Concentration of salt in sample, g/l	The number of microorganisms in a medium with the addition of ammonium sulphate, g/l CUE / g · 10 <sup>-12</sup>	The number of microorganisms in a medium with the addition of ammonium phosphate, g/l CUE / g · 10 <sup>-12</sup>	The number of microorganisms in a medium with the addition of ammonium dihydrogen phosphate, g/l CUE / g · 10 <sup>-12</sup>	The number of microorganisms in a medium with the addition of ammonium phosphate, g/l CUE / g · 10 <sup>-12</sup>
1	0,25	210±10	221±10	202±10	209±10
2	0,50	207±10	205±10	219±20	212±10
3	0,75	224±10	204±10	240±10	227±20
4	1,00	268±10	203±10	213±10	235±10
5	1,25	221±10	208±10	217±10	265±10
6	0	188±10	188±10	188±10	188±10

Thus, from the data presented, it can be seen that the introduction of salts in the nutrient medium: ammonium sulfate –1 g/l; Ammonium dihydrogen phosphate – 0.75 g/l, ammonium phosphate – 1.25 g/l, increases the amount of *Bacillus subtilis* VKPM B-12079 during the cultivation process (Table 1).

With the simultaneous addition of all salts to the nutrient medium at optimal concentrations for each salt, microorganism growth suppressed.

### References:

1. White A., Handler P., Smith E. L. *Principles of biochemistry*. Baltimore: The Johns Hopkins University School of Medicine, 1974. – 1051 p.

УДК 577.112:636.085.55

## О ПЕРСПЕКТИВАХ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В ПРОИЗВОДСТВЕ АМАРАНТОВОГО СИЛОСА

Павленкова С.В., Толкачева А.А., Анненков В.А., Корнеева О.С.  
Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия  
394036, Россия, г. Воронеж, проспект Революции, д. 19  
e-mail: sveta5501pavlenkova@yandex.ru

Представлено обоснование целесообразности применения рекомбинантных гидролаз (протеазы и липазы) в производстве высокобелкового амарантового силоса с целью обогащения ненасыщенными жирными кислотами и свободными аминокислотами. Получены рекомбинантные ферменты: протеаза и липаза, отличающиеся повышенной активностью по сравнению с аналогичными нативными ферментами.

**Ключевые слова:** амарантовый силос, протеаза, липаза, рекомбинантные ферменты

При использовании ферментных препаратов в процессе силосования отмечается снижение потерь питательных веществ в процессе хранения на 25-30%, нормализация величины pH, состава и соотношения органических кислот по сравнению с традиционными способами силосования без применения ферментов. В силу трудносилосуемости амарантового сырья наиболее часто применяемыми ферментами при его силосовании являются комплексы пектиназ, целлюлаз и ксиланаз, но не менее перспективным представляется использование протеаз и липаз в процессе предобработки, что позволяет повысить содержание ненасыщенных жирных кислот и свободных аминокислот в конечном продукте. В частности, усиление протеолиза в силосе при внесении ферментных препаратов ведет к увеличению на 20-30% аминного азота (свободных аминокислот) и, как следствие, повышает степень конверсии корма, усиливает иммунную устойчивость животных и снижает падеж молодняка. Предварительная обработка липазами ведет к повышению содержания ненасыщенных жирных кислот, являющихся структурной составляющей клеточных мембран, регуляторами обмена веществ, предшественниками простагландинов и других биологически активных веществ. Особенно высокую потребность в жире испытывают новорожденные животные. Как правило, у них наблюдается дефицит линолевой кислоты, и если в течение первой декады молодняк не получает этот важный фактор в жизни, то он неминуемо погибает.

Традиционно используемые в кормопроизводстве нативные ферменты обладают относительно низкой активностью и высокой стоимостью. При этом рекомбинантные ферментные препараты, в частности липазы и протеазы, лишены указанных недостатков в силу того, что их выход в процессе биосинтеза в разы превышает выход нативных ферментов. В связи с этим на кафедре биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО «ВГУИТ» были получены продуценты рекомбинантных протеазы и липазы из *B. subtilis* 168 на основе штамма *E. coli* C41. Был произведен индуцированный биосинтез указанных ферментов и определены его оптимальные условия, а также подобраны оптимальные значения pH и температуры для работы ферментов. Стандартными методами были определены активности ферментов. Полученная в результате биосинтеза новым штаммом рекомбинантная липаза по показателям активности превышала нативную в 12 раз, протеаза – в 10 раз.

Работа выполнена в рамках государственного задания №40.4149.2017/ПЧ.

### Литература:

1. Высочина Г. И. Амарант (*Amaranthus L.*): химический состав и перспективы использования (обзор) // Химия растительного сырья. 2013. № 2. С. 5-14.
2. Бондарев В. А., Косолапов В. М., Клименко В. П., Кричевский А. Н. Приготовление силоса и сенажа с применением отечественных биологических препаратов. М.: ФГБНУ ВНИИ кормов им. В.Р.Вильямса, 2016. 212 с.

UDC 577.112:636.085.55

## APPLICATION OF RECOMBINANT HYDROLYTIC ENZYMES IN THE PRODUCTION OF AMARANTH SILAGE

**Pavlenkova S.V., Tolkacheva A.A., Annenkov V.A., Korneeva O.S.**

*Voronezh state university of engineering technologies*  
394036, Russia, Voronezh, Revolutsii av., 19  
e-mail: sveta5501pavlenkova@yandex.ru

The expediency of using recombinant hydrolases (protease and lipase) in the production of high-protein amaranth silos is substantiated. It is shown that the use of hydrolases makes it possible to enrich the feed with unsaturated fatty acids and free amino acids. Recombinant enzymes were obtained: protease and lipase. These enzymes have an increased activity in comparison with similar native enzymes.

**Key words:** amaranth silage, protease, lipase, recombinant enzymes

When using enzymatic preparations in the ensilage process, the loss of nutrients during storage is reduced by 25-30%, the pH is normalized, the composition and the ratio of organic acids are improved in comparison with the traditional ensilage methods without the use of enzymes. When ensilage amaranth, the most frequently used enzymes are complexes of pectinases, cellulases and xylanases, but the use of proteases and lipases in the pretreatment process is no less promising, since this method allows increasing the content of unsaturated fatty acids and free amino acids in the final product. In particular, the increase in proteolysis in the silage with enzyme preparations leads to an increase of 20-30% amine nitrogen (free amino acids) and, as a result, increases the conversion rate of fodder, improve the immune resistance of animals and reduce the mortality of young animals. Preliminary treatment with lipases leads to an increase in the content of unsaturated fatty acids, which are a structural constituent of cell membranes, metabolism regulators, precursors of prostaglandins and other biologically active substances. A particularly high demand for fat is experienced by newborn animals. As a rule, they have a deficiency of linoleic acid, and if during the first decade the young does not receive this important factor in life, then it inevitably dies.

It should be noted that the production and use of recombinant enzyme preparations, in particular lipases and proteases, has several advantages over enzymes from natural sources, since recombinant enzymes are distinguished by high purity and low cost. In connection with the foregoing, the producers of recombinant proteases and lipases from *B. subtilis* 168 on the basis of *E. coli* strain C41 were obtained at the Department of Biochemistry and Biotechnology of Voronezh State University of Engineering Technologies. Further, the induced biosynthesis of these enzymes was made and optimal conditions for the synthesis and operation of enzymes were determined. Standard methods were used to determine the activity of enzymes. As a result of biosynthesis, recombinant lipase was obtained which is 12 times more active than the native enzyme. Recombinant protease is 10 times more active than native.

The work was carried out within the framework of the state task №40.4149.2017/PCh.

### References:

1. Vysochina G.I. *Amaranthus L.: chemical composition and perspectives of use (review) // Chemistry of plant raw materials*. 2013. № 2. P. 5-14.
2. Bondarev V.A., Kosolapov V.M., Klimenko V.P., Krichevsky A.N. *Preparation of silage and haylage using domestic biological preparations*. Moscow, All-Russian Scientific Research Institute of Forages named after V.R. Williams, 2016. 212 p.

УДК 631.81.036

## ПРЕДПОСЕВНАЯ ОБРАБОТКА СЕМЯН

Гарибян Ц. С.<sup>1</sup>, Акопян В. Б.<sup>2</sup>, Воробьева Г. И.<sup>3</sup>, Мартиросян Л. Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ ВНИИСБ

<sup>2</sup> МГТУ им. Н. Э. Баумана

<sup>3</sup> ФГБНУ ВНИТИБП

Москва, Россия

127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, дом 42

E-mail: tsovinar1980@mail.ru

Показана возможность применения низкочастотного ультразвука и фитостимулятора N-1 для интенсификации прорастания семян

**Ключевые слова:** семена, ультразвук, стимуляция, фитостимулятор

Ультразвуковая стимуляция создает необходимое разнообразие возможностей, обеспечивающее оптимальный выбор средств, для решения одной из важных задач земледелия - интенсификации роста и развития сельскохозяйственных растений.

Эффективными стимуляторами прорастания семян, роста и развития растений, оказался ультразвуковой (УЗ) метод предпосевной обработки семян и метод воздействия на семена раствором «Фитостимулятор N-1» (ФС), основанном на меланине дрожжей *Nadsoniella nigra*. На третий день после обработки семян овса, проращиваемых при комнатной температуре на фильтровальной бумаге в чашках Петри, длина проростков под влиянием ФС с концентрацией 0,1 мг/мл оказалось в 5 раз больше, а с концентрацией 1 мг/мл - в 7 раз больше, чем в контроле на смоченной водой бумаге в чашке Петри. Аналогичный, качественно совпадающий эффект наблюдался как при стимуляции (УЗ 22кГц, 30 с), так и при стимуляции ФС семян сои, что свидетельствует о не специфичности УЗ и ФС стимулирующих воздействий. С помощью низкочастотного ФС и УЗ воздействия с плотностью акустической мощности в интервале 0,1 - 1 Вт/см<sup>3</sup> удается значительно ускорить процесс прорастания глазков на смоченных водой миниклубнях картофеля. На 7-ой день после стимуляции, сравнение эффективности прорастания глазков, с не стимулированным контролем, выявил повышение прорастания в 4 раза после УЗ обработки и в 3 раза после обработки ФС, что также подтверждает не специфичность действия УЗ и ФС стимулирующих реализацию внутренних резервов растительных организмов.

UDC 631.81.036

## SEWING PREPARETING PROCESSING

Gharibyan Ts. S.<sup>1</sup>, Akopyan V. B.<sup>2</sup>, Vorobiova G. I.<sup>3</sup>, Martirosyan L. Yu.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russian research Institute of agricultural biotechnology

<sup>2</sup> MSTU named after N. E. Bauman

<sup>3</sup> All-Russian research and technological Institute of biological industry

Moscow, Russia

127550, Moscow, st. Timiryazevskaya, 42

E-mail: tsovinar1980@mail.ru

The possibility of using low-frequency ultrasound and the N-1 phytostimulant for intensifying seed germination

**Key words:** seeds, ultrasound, stimulation, phytostimulant

Ultrasound stimulation creates the necessary variety of possibilities, providing an optimal choice of means, for solving one of the important tasks of agriculture - intensification of growth and development of agricultural plants.

The ultrasound (US) method of presowing seed treatment and the method of influencing the seed with the "Phitostimulant N-1" solution (FS) based on the melanin of the yeast *Nadsoniella nigra* proved to be effective stimulators of seed germination, growth and development of plants. On the third day after the treatment of oat seeds, germinated at room temperature on filter paper in petri dishes, the length of the shoots under the influence of PS with a concentration of 0.1 mg / ml was 5 times greater, and at a concentration of 1 mg / ml - 7 times greater than in the control of water-soaked



paper in a Petri dish. A similar, qualitatively coinciding effect was observed both with stimulation (ultrasound 22kHz, 30 s) and with stimulation of the FS of soybean seeds, which indicates that the stimulation effects are not specific for ultrasound and PS. With the help of low-frequency FS and ultrasound with an acoustic power density in the range 0.1-1 W / cm<sup>3</sup>, it is possible to significantly accelerate the process of germination of eyes on water-soaked potato minitubers. On the 7th day after stimulation, a comparison of the efficiency of germination of eyes, with non-stimulated control, revealed an increase in germination 4-fold after ultrasound treatment and 3-fold after FS treatment, which also confirms the non-specificity of the action of US and FS stimulating the realization of internal reserves of plant organisms .

УДК 606:631:577

## ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИЭНЗИМНОГО ПРЕПАРАТА С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ СБРАЖИВАЕМЫХ УГЛЕВОДОВ ЗЕЛЕННОЙ МАССЫ АМАРАНТА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ВЫСОКОБЕЛКОВОГО АМАРАНТОВОГО СИЛОСА

Павленкова С.В.<sup>1</sup>, Исаева А.В.<sup>1</sup>, Свиридова Т.В.<sup>1</sup>, Шуваева Г.П.<sup>1</sup>, Мирошниченко Л.А.<sup>2</sup>, Корнеева О.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия  
394036, Россия, Воронеж, проспект Революции, д. 19

<sup>2</sup> ООО «Русская олива», Воронеж, Россия  
e-mail: sveta5501pavlenkova@yandex.ru

Установлено, что применение мультиэнзимного комплекса Вискозим L в процессе предварительной обработки зеленой массы амаранта способствует повышению сбраживаемых углеводов, что благоприятно сказывается на процессе молочно-кислого брожения при силосовании амаранта.

**Ключевые слова:** зеленая масса амаранта; сбраживаемые углеводы; амарантовый силос; мультиэнзимный препарат

В условиях Центрально-Черноземного региона в зимне-стойловый период основным сочным кормом для сельскохозяйственных животных является силос, удельный вес которого в рационах достигает 50 и более процентов по питательности. Энергетическая, питательная ценность и качество силоса во многом определяют уровень продуктивности сельскохозяйственных животных в этот период. [1]

Одной из перспективных высокобелковых кормовых культур является амарант, имеющий ценный химический состав. В зеленой массе амаранта в пересчете на абсолютно сухой вес содержится: сырого протеина 15,6-16,75% (а в листьях до 30%), жира - 2,4-2,8%, клетчатки (16-21,7 %) и водорастворимых сахаров (6,4-7,2 %), большое количество пектина (от 9,5 до 11,3 %), кальция 2,1-2,6%, фосфора 0,2-0,21%, каротина 160-200 мг. [2-3]. Однако амарант относится к трудносилосуемым кормовым культурам, т.к. его сахарный минимум равен 0,7, при нормальном значении данного показателя не менее 1,0 [3]. Для повышения силосуемости трудносилосуемых и несилосуемых культур применяют предобработку ферментными препаратами, которые способствуют повышению в силосуемой массе сбраживаемых сахаров за счет конверсии трудногидролизуемых полисахаридов. С целью получения качественного силоса из зеленой массы амаранта использовали промышленный мультиэнзимный препарат Вискозим L, проявляющий пектиназную (3000 ед./г), эндоглюканазную (100 ед./г) активности, а также в следовых количествах содержащий гемицеллюлазные ферменты эндогенного действия: эндогалактаназу, эндосиланазу, арабиназу и др.

Суспензию ферментного препарата (в количестве 5мл/кг зеленой массы) и закваску молочно-кислых бактерий смешивали и на стадии закладки в полимерные пакеты послойно обрабатывали измельченную зеленую массу амаранта, скошенного в фазе молочно-восковой спелости. О степени конверсии полисахаридов судили по накоплению редуцирующих сахаров. Установлено, что максимальное содержание сбраживаемых углеводов в опытном образце наблюдалось через 48 ч. ферментативного гидролиза и составило, в мг на 1г зеленой массы амаранта, 9,89 по сравнению с 4,0 перед началом гидролиза. В дальнейшем наблюдалось плавное снижение данного показателя до 4,73 через 120 ч. Степень конверсии полисахаридов составила 80%. Контролем служила заложенная в полимерные пакеты зеленая масса амаранта, без предварительной обработки ферментным препаратом. Накопление сбраживаемых сахаров к 48 ч. в контроле практически не изменилось с начальным значением и составило 2,7 мг на 1г зеленой массы амаранта, при этом степень конверсии полисахаридов составила 30%. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения мультиэнзимного комплекса Вискозим L для предобработки трудносилосуемой зеленой массы амаранта с целью повышения в ней сбраживаемых углеводов. Следует отметить, что содержание образовавшейся молочной кислоты, являющейся одним из важных показателей качества силоса, к 48 ч. в опытном образце было выше и составило 50% от суммы орга-

нических кислот, по сравнению 30% в контроле, что свидетельствует об интенсификации процесса молочнокислого брожения.

Исследования выполнены при поддержке государственного задания Минобрнауки РФ №40.4149.2017/ПЧ.

Литература:

1. Саратовский Л.И., Пономаренко А.В. Кормовой амарант Воронежской области// *Перспективы развития сельского хозяйства: кормопроизводство и кормление КРС как предпосылка высокой продуктивности в молочном и мясном скотоводстве.* – 2011. – С. 20-26.
2. Pavlenkova S.V., Shuvaeva G.P., Mesheryakova O.L., Miroshnichenko L.A., Korneeva O.S. Amaranth – A promising crop for fodder manufacturing// *Journal of biotechnology.* – 2017. – P.27.
3. Павленкова С.В., Шуваева Г.П., Мирошниченко Л.А., Свиридова Т.В., Мотина Е.А., Корнеева О.С. Сравнительная характеристика качественных показателей амарантового и кукурузного силоса. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий.* 2017;79(4):220-226. DOI:10.20914/2310-1202-2017-4-220-226

UDC 606:631:577

## THE USE OF MULTENZYME PREPARATION WITH THE AIM OF INCREASING FERMENTABLE CARBOHYDRATES IN GREEN MASS OF AMARANTH IN OBTAINING HIGH-PROTEIN AMARANTH SILAGE

Pavlenkova S.V.<sup>1</sup>, Isaeva A.V.<sup>1</sup>, Sviridova T.V.<sup>1</sup>, Shuvaeva G.P.<sup>1</sup>, Miroshnichenko L.A.<sup>2</sup>, Korneeva O.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Voronezh state university of engineering technologies, Voronezh, Russia  
394036, Russia, Voronezh, Revolutsii av., 19

<sup>2</sup> ООО «Russkaya Oliva», Voronezh, Russia  
e-mail: sveta5501pavlenkova@yandex.ru

The use of multienzyme complex Viscosim L in the pre-processing of green mass of amaranth promotes the fermentable of carbohydrates, which is beneficial effect to the process of lactic acid fermentation during the ensiling of amaranth.

**Key words:** green mass of amaranth; fermentable carbohydrates; amaranth silage; multienzyme preparation

In the conditions of the Central Chernozem region in the winter-stall period, the main juicy feed for farm animals is silage, the proportion of which in rations reaches 50% or more of nutritional value. Energy, nutritional value and quality of silage largely determine the level of productivity of farm animals during this period. [1]

One of the promising high-protein fodder crops is amaranth, which has a valuable chemical composition. In green mass of amaranth in terms of absolutely dry weight contains: crude protein 15,6-16,75% (and in leaves to 30%), fat-2,4-2,8%, cellulose (16-21, 7 %) and water-soluble sugars (6,4-7,2 %), a large amount of pectin (from 9,5 to 11,3 %), calcium 2,1-2,6%, phosphorus 0,2-0,21%, carotene 160-200 mg. [2-3] However, amaranth belongs to hard-to-reach forage crops, since its sugar minimum is 0.7, with a normal value of this indicator is not less than 1.0.[3] To improve ensilage capacity hardly ensilaged and unensilaged crops apply pre-processing enzyme preparations, which contribute to being in the silage mass of fermentable sugars due to the conversion of polysaccharides. In order to obtain a high-quality silage from the green mass of amaranth used industrial multienzyme preparation Viscosim L, showing pectinase (3000 units/g), endoglucanase (100 units/g) activity, as well as trace amounts containing hemicellulose enzymes of endogenous action: endogalactanase, endoxylanase, arabinase, etc.

The suspension of the enzyme preparation (in the amount of 5ml/kg of green mass) and the leaven of lactic acid bacteria were mixed and at the stage of laying in polymer bags layer by layer treated crushed green mass of amaranth, beveled in the phase of milky-wax ripeness. The degree of conversion of polysaccharides was determined by the accumulation of reducing sugars. It is established that the maximum content of fermentable carbohydrates in the prototype was observed after 48 h of enzymatic hydrolysis and made up, in mg per 1 g of green mass of amaranth, of 9.89 compared to 4.0 before hydrolysis. In the future, there was a smooth decline in this indicator to 4.73 in 120 hours. The conversion rate of polysaccharides was 80%. The control was the green mass of amaranth put in plastic bags, without preliminary treatment with an enzyme preparation. Accumulation of fermentable sugars by 48 hours in the control practically unchanged from the initial value and amounted to 2.7 mg per 1 g of green mass of amaranth, with the degree of conversion of polysaccharides was 30%. The data obtained testify to expediency of application of multienzyme complex Viscosim L for preprocessing hardly ensilaged green mass of amaranth with the aim of improving her fermentable carbohydrates. It should be noted that the content of formed lactic acid, which is one of the important indicators of the quality of silage for 48 h in the prototype was higher and amounted to 50% of the amount of organic acids, compared to 30% in the control group, that testifies to the intensification of the process of lactic fermentation.

The research was carried out with the support of the state task Ministry of education and science of the Russian Federation №40.4149.2017/ПЧ.

References:

1. Duborezov V.M., Kirnos I.O., Vasilyev N.I. Ways of solving the protein problem in dairy cattle// *The dairy industry*. – 2011. – №6. – P. 70-71.
2. Pavlenkova S.V., Shuvaeva G.P., Mesheryakova O.L., Miroshnichenko L.A., Korneeva O.S. Amaranth – A promising crop for fodder manufacturing// *Journal of biotechnology*. – 2017. – P.27.
3. Pavlenkova S.V., Shuvaeva G.P., Miroshnichenko L.A., Sviridova T.V., Motina E.A., Korneeva O.S. Comparative characteristics of qualitative indicators of amaranth and corn silage. *Proceedings of the Voronezh State University of Engineering Technologies*. 2017;79(4):220-226. (In Russ.) DOI:10.20914/2310-1202-2017-4-220-226

УДК 615.322:547.918

## СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ СО<sub>2</sub>-ЭКСТРАКЦИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ СОЕДИНЕНИЙ ГИНЗЕНОЗИДОВ, ПОЛУЧАЕМЫХ ИЗ ДИКОРАСТУЩЕГО ЖЕНЬШЕНЯ PANAX GINSENG C.A. MEYER.

М.П. Разгонова <sup>1</sup>, Т.К. Каленик <sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, НОЦ «Нанотехнологии», Инженерная школа, Владивосток, Россия.

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Школа Биомедицины, Владивосток, Россия.

Email: Razgonova.mp@dvvfu.ru

В работе впервые была исследована сверхкритическая флюидная СО<sub>2</sub>-экстракция корня дальневосточного дикорастущего женьшеня Panax Ginseng C.A.Meyer при различных температурах и давлениях. Используя СО<sub>2</sub>+С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН, как модель, было исследовано несколько экспериментальных условий в диапазоне давлений 200–400 бар, содержания этанола от 3 до 5% в жидкой фазе, при температуре в пределах 40-70. Была проведена ВЭЖХ всех полученных экстрактов и установлено количественное содержание гинзенозидов в полученных анализах.

**Ключевые слова:** Углекислый газ; Сверхкритическая экстракция; Женьшень; Гинзенозиды; ВЭЖХ.

Суб- и сверхкритические технологии давно нашли широкое применение в химии, что обусловлено, прежде всего, их уникальными свойствами. Они используются при экстракции, хроматографировании, как растворитель для проведения многих гетерогенных процессов. Уникальные свойства сверхкритических жидкостей послужили основой их применения в экстракции термолабильных соединений из натуральных матриц растений, в частности дальневосточного женьшеня Panax ginseng C.A.Meyer.

Сверхкритические флюидные процессы, которые используют жидкость выше критической температуры и критического давления - активная область исследования для сепарации и экстракции, особенно натуральных продуктов. SCF предлагает экстракцию по типу обычных органических растворяющих методов, но используя минимальные суммы органических модификаторов, таким образом проводя процесс при намного более мягких условиях. Технология SCF использует уникальные свойства этих жидкостей для проникновения из субстрата в матрицу клетки для проведения мягкой экстракции. У сверхкритической флюидной СО<sub>2</sub>-экстракции есть преимущества – это низкое термическое разрушение биологически активных веществ и безопасность для пищевых продуктов.

В экспериментах были использованы:

1.1 Дикий женьшень (Panax ginseng C. A. Meyer) был куплен в Лазовском районе Приморья. Все аналитические качественные растворители, включая ацетонитрил марки UN 1648 (PanReas AppliChem, Германия), метанол, этанол для сверхкритической СО<sub>2</sub>-экстракции и хроматографирования поставлялись ДВФУ. Деионизированная используемая вода сорта HPLC была подготовлена на аппарате Siemens Ultra Clear (Siemens, Германия).

1.2 Для сверхкритической СО<sub>2</sub>-экстракции использовался экстракционный аппарат сверхкритического давления Thar SFC, S.N. 3526551, США).

1.3 Для процесса хроматографирования использовался жидкостной хроматограф Shimadzu LC-20 Prominence UFLC с квадрупольным хроматомасс-спектрометром LCMS-2020, Япония.

1.4 Смешанные стандартные растворы гинзенозидов поставлялись ДВФУ в виде отдельных герметичных ампул по 0,5 мл. При разбавлении до соответствующих концентраций растворы гинзенозидов служили для

установления времени удерживания и в качестве независимых калибровочных стандартов.

Хроматографический анализ экстракции указал на присутствие шести общих гинзенозидов Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1. В дополнение к этим общим гинзенозидам, четыре кислотных гинзенозида, которые называют «дынные» гинзенозиды, также представлены в значительных количествах в корне женьшеня. Было выделено 43 хроматографических пика, соответствующих соединениям гинзенозидов в женьшене. Тем самым доказана экспериментальная возможность получения наиболее чистых термолабильных биологически активных веществ из природных матриц, используя революционную «зеленую» сверхкритическую CO<sub>2</sub>-экстракцию.

Сверхкритическая экстракция, используя CO<sub>2</sub> и C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, как модификатор, технически выполнимый метод для экстракции гинзенозидов женьшеня, хотя требовались относительно высокие количества модификатора и следовательно более высокие эксплуатационные условия (например, температура, давление). Этанол - эффективный модификатор для сверхкритической экстракции, значительно усилена экстракция по сравнению с чистым экстрагированием CO<sub>2</sub>, и полученным незначительным количеством гинзенозидов.

Литература:

1. Assinewe V.A., Baum B.R., Gagnon D., Arnason J.T. *Phytochemistry of wild populations of Panax quinquefolius L. (North American ginseng)* // *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol.51. Pages 4549–4553.
2. Bitencourt Raphaela G., Carmen L. Queiroga, Ílio Montanari Junior, Fernando A. Cabral. *Fractionated extraction of saponins from Brazilian ginseng by sequential process using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water.* // *The Journal of Supercritical Fluids.* 2015. Vol.92. Pages 272-281.
3. Chien Yun-Shan, Yu Z., Koo M. and Wang B. *Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of Panax ginseng.* // *Separation Science and Technology.* 2016. Vol.51, No. 6, Pages 954–960.
4. Court W.A., Hendel J.G., Elmi J., *Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of ginsenosides of Panax quinquefolium.* // *J. Chromatogr.* 1996. A 755. Pages 11–17.
5. Hu C. and Kitts D.D. *Free radical scavenging capacity as related to antioxidant activity and ginsenoside composition of Asian and North American ginseng extracts.* // *J. Am. Oil Chem.* 2001. Soc. 78, Pages 249–255.
6. Huang Y., Zhang T., Crommen J., Jiang Z. *Fast separation of triterpenoid saponins using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry.* // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2016. Vol.121. Pages 22–29.
7. I-Lung Y., Zer-Ran Y., Koo M. and Wang B. *A continuous fractionation of ginsenosides and polysaccharides from Panax ginseng using supercritical carbon dioxide technology.* // *Journal of Food Processing and Preservation.* 2015. Vol.40. Issue 4. Pages 743-748.
8. Kang, K.S., Yamabe, N., Kim, H.Y., Okamoto, T., Sei, Y. and Yokozawa, T. *Increase in the free radical scavenging activities of American ginseng by heat processing and its safety evaluation.* // *J. Ethnopharmacol.* 2007. Vol.113. Pages 225–232.
9. King, J.W. *Advances in critical fluid technology for food processing.* // *Food Sci. Technol. Today.* 2000. Vol.14. Pages 186–191.
10. Kite G.C., Howes M.R., Leon C.J., Simmonds M.S.J. *Liquid chromatography/mass spectrometry of malonyl-ginsenosides in the authentication of ginseng.* // *Rapid Commun.* // *Mass Spectrom.* 2003. Vol.17. Pages 238–244.
11. Leal P.F., Kfoury M.B., Alexandre F.C., F.H.R.F. Agundes, J.M. Prado, M.H. Toyama, M.A.A. Meireles. *Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity.* // *The Journal of Supercritical Fluids.* 2010. Vol. 54. Pages 38–45.
12. Quan Can, Shufen Li, Songjiang Tian, Hong Xu, Anqing Lin, Long Gu. *Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in ginseng.* // *The Journal of Supercritical Fluids.* 2004. Vol.31. Pages 149–157.
13. Wang Huang-Chung, Chen Chao-Ruey, Chiehming J. Chang. *Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides.* // *Food Chemistry.* 2001. Vol. 72. Pages 505±509.
14. Wood Jeffery A., Bernards Marc A, Wan-kei Wan, Charpentier Paul A. *Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide.* // *The Journal of Supercritical Fluids.* 2006. Vol.39. Pages 40–47.

УДК 615.322:547.918

## **SUPERCritical CO<sub>2</sub>-EXTRACTION IN THE STUDY OF GINSENOSES OBTAINED FROM WILD-GROVING GINSENG PANAX GINSENG C.A. MEYER**

**Razgonova M.P. <sup>1</sup>, Kalenik T.K. <sup>2</sup>**

e-mail: kalenik.tk@dvvu.ru

<sup>1</sup> FGAOU VO Far-Eastern Federal University, SEC Nanotechnology, Engineering School, Vladivostok, Russia.

<sup>2</sup> FGAOU VO Far-Eastern Federal University, School of Biomedicine, Vladivostok, Russia.

This work was the first to study supercritical fluid CO<sub>2</sub>- extraction of the root of Far East wild ginseng Panax Ginseng C.A. Meier at various temperatures and pressures. Using CO<sub>2</sub> and C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH as a model, several experimental conditions were investigated in the pressure range 200-400 bar, ethanol content from 3 to 5% in the liquid phase, at a temperature within 40-70 °C. HPLC of all extracts was performed and the quantitative content of ginsenosides in the analytes was determined.

**Key words:** Carbon dioxide; Supercritical extraction; Ginseng; Ginsenosides; HPLC.

Sub- and supercritical technologies have long been widely used in chemistry, which is due, above all, to their unique properties. They are used for extraction, chromatography, as a solvent for many heterogeneous processes. The unique properties of supercritical fluids served as the basis for their application in the extraction of thermolabile compounds from natural plant matrices, in particular, the Far East ginseng *Panax ginseng* C.A. Meier.

Supercritical fluid processes that use the liquid above the critical temperature and critical pressure are the active research areas for separation and extraction, especially natural products. SCF offers extraction by the type of conventional organic solvent methods, but using minimal amounts of organic modifiers, thus conducting the process under much milder conditions. SCF technology uses the unique properties of these fluids to penetrate from the substrate into the matrix of the cell for soft extraction. Supercritical fluid CO<sub>2</sub> extraction has advantages - it is a low thermal destruction of biologically active substances and safety for food products.

In the experiments we used:

1.1 Wild ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) was purchased in Lazovsky district of Primorye. All analytical qualitative solvents, including UN 1648 acetonitrile (PanReac AppliChem, Germany), methanol, ethanol for supercritical CO<sub>2</sub> extraction and chromatography were supplied by FEFU. Deionized water of HPLC grade was prepared on Siemens Ultra Clear (Siemens, Germany).

1.2 For supercritical CO<sub>2</sub>-extraction, an extraction apparatus of supercritical pressure Thar SFC, S.N. 3526551, USA).

1.3 For the chromatography process, a Shimadzu LC-20 Prominence UFLC liquid chromatograph was used with a LCMS-2020 quadrupole chromatographic mass spectrometer, Japan.

1.4 Mixed standard solutions of ginsenosides were supplied by the FEFU in the form of a separate sealed 0.5 ml ampoules. When diluted to appropriate concentrations, solutions of ginsenosides served to establish the retention time and as independent calibration standards.

Chromatographic analysis of extraction indicated the presence of six common ginsenosides Rb<sub>1</sub>, Rb<sub>2</sub>, Rc, Rd, Re, Rg<sub>1</sub>. In addition to these common ginsenosides, four acidic ginsenoside, called "melon" ginsenosides, are also present in significant amounts in the ginseng root. 43 chromatographic peaks corresponding to compounds of ginsenosides in ginseng were isolated. This proves the experimental possibility of obtaining the most pure thermolabile biologically active substances from natural matrices, using the revolutionary "green" supercritical CO<sub>2</sub> extraction.

Supercritical extraction using CO<sub>2</sub> and C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH as a modifier is a technically feasible method for extracting ginsenosides from ginseng, although relatively high amounts of modifier and hence higher operating conditions (for example, temperature, pressure) are required. Ethanol is an effective modifier for supercritical extraction; extraction is significantly enhanced compared to pure CO<sub>2</sub> extraction, and to small amounts of ginsenosides obtained.

#### References:

1. Assinewe V.A., Baum B.R., Gagnon D., Arnason J.T. *Phytochemistry of wild populations of Panax quinquefolius L. (North American ginseng)* // *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol.51. Pages 4549–4553.
2. Bitencourt Raphaela G., Carmen L. Queiroga, Ílio Montanari Junior, Fernando A. Cabral. *Fractionated extraction of saponins from Brazilian ginseng by sequential process using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water.* // *The Journal of Supercritical Fluids.* 2015. Vol.92. Pages 272-281.
3. Chien Yun-Shan, Yu Z., Koo M. and Wang B. *Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of Panax ginseng.* // *Separation Science and Technology.* 2016. Vol.51, No. 6, Pages 954–960.
4. Court W.A., Hendel J.G., Elmi J., *Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of ginsenosides of Panax quinquefolium.* // *J. Chromatogr.* 1996. A 755. Pages 11–17.
5. Hu C. and Kitts D.D. *Free radical scavenging capacity as related to antioxidant activity and ginsenoside composition of Asian and North American ginseng extracts.* // *J. Am. Oil Chem.* 2001. Soc. 78, Pages 249–255.
6. Huang Y., Zhang T., Crommen J., Jiang Z. *Fast separation of triterpenoid saponins using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry.* // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2016. Vol.121. Pages 22–29.
7. I-Lung Y., Zer-Ran Y., Koo M. and Wang B. *A continuous fractionation of ginsenosides and polysaccharides from Panax ginseng using supercritical carbon dioxide technology.* // *Journal of Food Processing and Preservation.* 2015. Vol.40. Issue 4. Pages 743-748.
8. Kang, K.S., Yamabe, N., Kim, H.Y., Okamoto, T., Sei, Y. and Yokozawa, T. *Increase in the free radical scavenging activities of American ginseng by heat processing and its safety evaluation.* // *J. Ethnopharmacol.* 2007. Vol.113. Pages 225–232.
9. King, J.W. *Advances in critical fluid technology for food processing.* // *Food Sci. Technol. Today.* 2000. Vol.14. Pages 186–191.
10. Kite G.C., Howes M.R., Leon C.J., Simmonds M.S.J. *Liquid chromatography/mass spectrometry of malonyl-ginsenosides in the authentication of ginseng, Rapid Commun.* // *Mass Spectrom.* 2003. Vol.17. Pages 238–244.
11. Leal P.F., Kfoury M.B., Alexandre F.C., F.H.R.F. Agundes, J.M. Prado, M.H. Toyama, M.A.A. Meireles. *Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity.* // *The Journal*

*of Supercritical Fluids*. 2010. Vol. 54. Pages 38–45.

12. Quan Can, Shufen Li, Songjiang Tian, Hong Xu, Anqing Lin, Long Gu. *Supercritical fluid extraction and clean-up of organochlorine pesticides in ginseng*. // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2004. Vol.31. Pages 149–157.

13. Wang Huang-Chung, Chen Chao-Ruey, Chiehming J. Chang. *Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides*. // *Food Chemistry*. 2001. Vol. 72. Pages 505±509.

14. Wood Jeffery A., Bernards Marc A, Wan-kei Wan, Charpentier Paul A. *Extraction of ginsenosides from North American ginseng using modified supercritical carbon dioxide*. // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2006. Vol.39. Pages 40–47.

УДК 637.055

## **СКРИНИНГ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ 35-S, FMV, NOS И СТР2-СР4-EPSPS В КОРМАХ И КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ С 2016 ПО 2017 ГГ.**

**Гузеева А.А., Цыдыпова О.Ц., Спиридонов А.В., Капитова И.А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

Адрес: Россия, 123022, Москва, Звенигородское шоссе д.5

Телефон/факс: +7 (495) 982-50-84, +7 (499) 253-14-91

E-mail: gmo-lab@vgnki.ru, spi-a@yandex.ru

Проводилось исследование кормов на наличие регуляторных последовательностей: промоторов 35-S, FMV, терминатора NOS и генов СТР2-СР4-EPSPS. В результате мы обнаружили наибольшее количество трансгенов в соевом шроте и комбикормах для свиней.

**Ключевые слова:** ПЦР, секвенирование, ГМО, промотор, терминатор, ген

Благодаря разработке новых и совершенствованию имеющихся методов молекулярно-генетического изучения геномов живых организмов, идет активное развитие сельскохозяйственной биотехнологии. Результатами этих работ является производство и массовое внедрение в сельское хозяйство новых генно-модифицированных сортов и форм растений. Использование трансгенных растений при селекции ускоряет процесс получения нового сорта и снижает себестоимость этого процесса. Также это позволяет получить организмы с уникальными свойствами, определяемыми встраиваемой генетической конструкцией.

На базе нашего института проводились исследования по выявлению регуляторных последовательностей в образцах комбикормов и кормовых добавок

Мы производили обнаружение ГМО тестируя их на наличие регуляторных ДНК-последовательностей: промоторов 35-S, FMV, терминатора NOS и генов СТР2-СР4-EPSPS. Все они необходимы для экспрессии основного гена во встраиваемой генетической конструкции. 35-S – последовательность, полученная из вируса мозаики цветной капусты, NOS – получен из генома *Agrobacterium tumefaciens*, FMV- получена из вируса мозаики норичника, СТР2-СР4-EPSPS – ген фермента *Agrobacterium tumefaciens*

За период 2016-2017 года нами были изучено 14412 проб. Из них 5440 проб показали положительный результат по наличию регуляторных ГМО последовательностей 35-S, FMV, NOS и СТР2-СР4-EPSPS. Исследования проводились методом RealTimeПЦР.

Анализ полученных образцов показал следующее - выявление ГМО элементов: 18,5%-промотор 35S, терминатор NOS; 15,6% - промотор FMV, генетическая конструкция СТР2-СР4-epsps;

Особенно много ГМО материала было обнаружено в соевом шроте и комбикормах для свиней.

Литература:

1. А.И. Клименко, Г.В. Максимов, В.Н. Василенко ПРОБЛЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ // 2(26)2014 Технологии, средства механизации и энергетическое оборудование© 2014 г.

2. Александра Викторовна Комарова ПОЛЬЗА И ВРЕД ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ. // Вестник ТГУ, выпуск 7 (87), 2010

3. Н.Е. Сороколетова, Е.И. Кондратенко, доцент Н.А. Ломтева, доцент Н.В. Нетипанова Современные аспекты использования генно-модифицированных компонентов в продуктах питания и методы их обнаружения// Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК - продукты здорового питания, № 4, 2014

4. Тышко Н.В. Контроль за генно-инженерно-модифицированными организмами растительного происхождения в пищевой продукции: научное обоснование и методическое обеспечение // *Вопр. питания*. 2017. Т. 86. № 5. С. 29–33.

UDC 637.055

## SCREENING OF 35-S, FMV, NOS AND CTP2-CP4-EPSPS REGULATORY SEQUENCES IN FEEDS AND FEED ADDITIVES FROM 2016 TO 2017

**Guzeeva A. A., Tsydyanova O. C., Spiridonov A.V., Kapitonov I. A.**

Federal state budgetary institution "the all-Russian state Center of quality and standardization of medicines for animals and forages" (fgbi "VGNKI")

Address: Russia, 123022, Moscow, Zvenigorodskoe shosse 5

Telephone / Fax: +7 (495) 982-50-84, +7 (499) 253-14-91

E-mail: gmo-lab@vgnki.ru

The study was conducted aft to the presence of regulatory sequences: promoters 35-S, FMV, terminator of the NOS gene and the CTP2-CP4-EPSPS. As a result, we found the largest number of transgenes in soybean meal and feed for pigs.

**Key words:** PCR, sequencing, GMO, promoter, terminator, gene

Thanks to the development of new and improved methods of molecular genetic study of genomes of living organisms, there is an active development of agricultural biotechnology. The results of these works are the production and mass introduction into agriculture of new genetically modified varieties and forms of plants. The use of transgenic plants in selection accelerates the process of obtaining a new variety and reduces the cost of this process. It also allows obtaining organisms with unique properties determined by embedded genetic structure.

On the basis of our Institute conducted research to identify regulatory sequences in samples of feed and feed additives

We performed detection of GMOs testing them for the presence of regulatory DNA sequences: promoters 35-s, FMV, terminator NOS and genes CTP2-CP4-EPSPS. All of them are necessary for the expression of the main gene in the embedded genetic structure. 35-S – a sequence derived from cauliflower mosaic virus, the NOS – derived from the genome of *Agrobacterium tumefaciens*, FMV - obtained from the virus of the mosaic of norichika, CTP2-CP4-EPSPS – gene from *Agrobacterium tumefaciens* enzyme.

During the period 2016-2017, we studied 14412 samples. Of these, 5440 samples showed a positive result in the presence of regulatory GMO sequences 35-s, FMV, NOS and CTP2-CP4-EPSPS. Studies were carried out by Real time PCR.

The analysis of the obtained samples showed the following-detection of GMO elements: 18.5% - 35S promoter, NOS terminator; 15.6% - FMV promoter, CTP2-CP4-epsps genetic structure;

Especially a lot of GMO material was found in soybean meal and feed for pigs.

### References:

1. A. I. Klimenko, G. V. Maksimov, V. N. Vasilenko PROBLEMS of the use of GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN AGRICULTURE // 2(26)2014 Technology, means of mechanization and power equipment© 2014
2. Alexander V. Komarov BENEFITS AND HARMS of GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS. // Vestnik TGU, issue 7 (87), 2010
3. N. E. Sorokoletova, E. I. Kondratenko, associate Professor N.. Lomteva, assistant Professor N. In. Nativenewyorker aspects of the use of genetically modified ingredients in food products and methods for their detection// Technologies of food and processing industry of AIC - healthy food No. 4, 2014
4. Tyshko N. In. Control over genetically modified organisms of plant origin in food products: scientific justification and methodological support // Vopr. foods. 2017. T. 86. No. 5. PP 29-33.

УДК 57.085.23

## СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ, В ТОМ ЧИСЛЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Савченкова И.П., Васильева С.А., Коровина Д.Г., Викторова Е.В., Волкова И.М., Савченкова Е.А.  
ФГБНУ НИИ экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ), Москва, Россия  
109428, Москва, Рязанский проспект, д.24, корп.1  
e-mail: s-ip@mail.ru

Стволовые клетки млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных, являются перспективным материалом для создания новых клеточных систем с заданными свойствами *in vitro* в связи с чем получение отечественных культур СК и их депонирование является одним из приоритетных направлений в развитии биотехнологии на современном этапе.

**Ключевые слова:** коллекция, стволовые клетки, сельскохозяйственные животные, депонирование, характеристика, хранение.

Коллекции клеточных культур животных и человека выполняют важную роль в сохранении генофонда. Криоконсервация генетического материала одновременно с разработкой методов биологии развития являются основными способами сохранения биоразнообразия, наряду с выделением охраняемых территорий и искусственным разведением животных в зоопарках, питомниках, на фермах. Основными задачами коллекций культур клеток являются поступление, сбор новых образцов культур клеток, их характеристика, хранение и распространение. Создание коллекции культур стволовых клеток (СК) млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных, особенно актуально для развития существующих коллекций культур клеток, в связи с уникальными свойствами этих клеток *in vitro*. СК являются новой клеточной моделью для проведения фундаментальных исследований в биологии, биотехнологии, медицине и ветеринарии.

В лаборатории ведутся исследования по получению культур мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК) млекопитающих. Из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) крупного рогатого скота (КРС) получены ММСК, изучены их свойства. Данные популяции клеток депонированы в Специализированную Коллекцию перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко. Из КМ овец и пуповинной крови лошадей, а также из ЖТ кошек и собак, получены культуры клеток с характеристиками ММСК, которые готовятся к депонированию. Разработаны методы выделения из КМ, ЖТ, дермы кожи, пуповинной крови сельскохозяйственных и мелких домашних животных клеток с характеристиками ММСК и поддержания их в культуре. Продемонстрирована возможность получения клеток жировой, костной, хрящевой и мышечной тканей, посредством индукции ММСК *in vitro*. В лаборатории оптимизированы методы по выделению сперматогоний типа А из тестикул хряков и их культивированию.

Разрабатываются единые требования к качеству коллекционного материала, паспортов, методов анализа, хранения и контроля культур клеток. Создаются информационные базы данных по культурам СК посредством издания информационного каталога. Совершенствуются методы ведения коллекции на основе проведения научных исследований, посвященных изучению влияния условий культивирования, криоконсервации и контаминации на генетическую изменчивость клеточных линий, а также сохранению клеток во время транспортировки посредством заключения их в термолабильный гель.

СК млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных являются перспективным материалом для создания новых клеточных систем с заданными свойствами *in vitro* в связи с чем получение культур СК и их депонирование является одним из приоритетных направлений в развитии биотехнологии на современном этапе.



UDC 57.085.23

## FORMATION OF THE MAMMALIAN STEM CELLS COLLECTION, INCLUDING FARM ANIMALS

Savchenkova I.P., Vasilieva S.A., Korovina D.G., Viktorova E.V., Volkova I.M., Savchenkova E.A.

All Russian State Research Institute of Experimental Veterinary Medicine of Ya.R. Kovalenko, Russia, Moscow, Ryazanskiy Ave, 24/1  
e-mail: s-jp@mail.ru

Mammalian stem cells, including farm animals, are a promising material for generation of new cellular systems with desired properties in vitro in this connection the obtain of the stem cell cultures and their deposition is one of the priority areas for biotechnology development at the present stage.

**Key words:** collection, stem cells, farm animals, deposition, characterization, storage.

Collections of cell cultures of animals and the person carry out an important role in preservation of a gene pool. Cryopreservation of genetic material along with development of methods of biology development is the main ways of preservation of a biodiversity, along with selection of the protected territories and artificial breeding animals in zoos, nurseries, on farms. Main goals of collections of cell cultures are receipt, collecting new exemplars of cell cultures, their characteristic, storage and distribution. Formation of mammalian stem cell (SCs) cultures collection, including farm animals, is especially relevant for development of the existing collections of cell cultures, in connection with unique properties of these cells in vitro. SCs are new cell model for carrying out basic researches in biology, biotechnology, medicine and a veterinary medicine.

In laboratory researches on obtaining cultures of the mammalian multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) are conducted. MMSCs are received from the bovine bone marrow (BM) and the adipose tissue (AT), their properties are studied. These populations of cells are deposited with the Specialized Collection of the somatic cell cultures of farm and trade animals at VIEV of Ya.R. Kovalenko. From sheep BM and equine umbilical blood and also from cat and dog AT, the cell cultures with characteristics of MMSCs which prepare for deposition are received. Cell isolation methods from BM, AT, dermas of skin, umbilical blood of farm animals and pets with characteristics of MMSCs and their maintaining in culture are developed. The possibility of receiving cells of adipose, bone, cartilage and muscle tissues, by means of an induction of MMSCs in vitro is shown. In the laboratory methods of isolation of type A spermatogonia from boars testicles and to their culturing are optimized.

Uniform requirements to quality of collection material, passports, methods of the analysis, storage and monitoring of cultures of cells are developed. Informational databases on the cultures of SCs by means of the regular edition of the informational catalog are created. Methods of maintaining a collection on the basis of carrying out the scientific research devoted to studying of influence of conditions of cultivation, a cryopreservation and contamination on genetic variability of cell-like lines are improved and also to preservation of cells are developed during transportation by means of the conclusion them in thermolabile gel.

Mammalian stem cells, including farm animals, are a promising material for generation of new cellular systems with desired properties in vitro in this connection the obtain of the stem cell cultures and their deposition is one of the priority areas for biotechnology development at the present stage.

УДК 633.521: 575.224.46.044

## СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ ЛЬНА НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА

К.П.Королев

Тюменский государственный университет, Россия, 625003, Тюмень, Володарского, 6, corolev.konstantin2016@yandex.ru, 89829722770

Впервые на льне-долгунце использованы новые химические мутагены (нитрозогуанидин и фосфемид). На основании лабораторно-полевого скрининга выявлены особенности мутационной изменчивости у коллекционных образцов и сортов льна. Получены мутантные популяции с фенотипическими изменениями представляющие практический интерес.

**Ключевые слова:** мутагены, фосфемид, хлорофилл, изменчивость, культурные растения, стресс.

Создание новых сортов льна основано на разнообразном исходном материале (коллекционные образцы, гибридные формы). Одним из перспективных методов селекции, является метод индуцированного мутагенеза, и прежде всего, химического, что подтверждено многочисленными исследованиями (Ивашко, 1987, Королев, 2013, 2016, 2017). В связи с этим, нами впервые изучено влияние химического мутагена нитрозогуанидина и фосфемиды на сорта и коллекционные образцы льна-долгунца. Выявлено, что при высоких концентрациях химических соединений происходило изменение морфометрических показателей проростков, энергии прорастания и лабораторной всхожести семян. Следует отметить, что наиболее высокое ингибирующее влияние у образцов льна отмечено при концентрации 0,1%.

Полевое изучение полученных мутантных популяций льна проводили на опытном поле РУП «Институт льна» (Республика Беларусь) и экспериментальном участке «Биостанция «Озеро Кучак» (Российская Федерация) на дерново-подзолистой супесчаной почве с оптимальными агрохимическими показателями.

Прорастание семян в значительной степени определяет дальнейший рост и развитие растений. В результате исследований было установлено неоднозначное влияние нитрозогуанидина и фосфемиды на семена льна. Как известно (Симаш, Королев, 2012) о мутационном влиянии судят по изменениях индивидуально-популяционных признаков.

В наших исследованиях выявлено стимулирующее воздействие на полевую всхожесть семян, высоту растений, массу стебля и массу волокна невысоких концентраций химическим соединений с мутационным эффектом.

В наших исследованиях выявлено стимулирующее воздействие на полевую всхожесть семян, высоту растений, массу стебля и массу волокна невысоких концентраций химическим соединений с мутационным эффектом. В результате лабораторно-полевых опытов получены новые данные по особенностям мутационной изменчивости у коллекционных образцов и сортов льна-долгунца при воздействии соединений химической природы. Отобраны популяции с фенотипическими изменениями, которые представляют интерес для дальнейшего изучения.

#### Литература:

1. Ambreen, A. 2011. Cytological effect of ethyl methane sulphonate and sodium azide in (*Linum usitatissimum* L.). *International journal of plant, animal and environmental sciences*, 2(1): 70-75.
2. Bretagne-Sagnard, B. 1995. Induced albino mutations as a tool for genetic analysis and cell biology in flax (*Linum usitatissimum* L.) *Journal of Experimental Botany*, 47 (295): 189-194.
3. Chantreau M., Grec S., Gutierrez L., Dalmais M. 2013. PT-Flax (phenotyping and TILLinG of flax): development of a flax (*Linum usitatissimum* L.) mutant population and TILLinG platform for forward and reverse genetics. *BMC Plant Biology*, 13:159.
4. Chantreau M., Portelette A., Dauwe R., Kiyoto S., Cronier D. 2014. Ectopic lignification in the flax lignified bast fiber1 mutant stem is associated with tissue-specific modifications in gene expression and cell wall composition. *The Plant Cell*, 26(11): 4462-4482. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.13044>.
5. Green, A., Marshall D. 1984. Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum* L.) having reduced linolenic acid content. *Euphytica*, 33: 321-328.
6. Green, A. 1986. A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil. *Canadian Journal Plant Science*, 66: 499-503.
7. Ivashko, L. 1988. The use of mutagenesis method in the selection of flax. *Chemical mutagenesis in the selection process*, 158-160. (in Russian).
8. Korolev K., Bome N., Abetova A. 2017. Mutation effect of nitrozoquanidine when exposed to flax varieties (*Linum usitatissimum* L.) of various ecological and geographical origins. *Tobolsk Scientific*, 84-87. (in Russian).
9. Kupyanskaya, N. 1978. The effect of chemical mutagens on flax. *Breeding, seed growing and agrotechnics of flax cultivation*, 15: 3-5. (in Russian).
10. Rowland G. 1991. An EMS-induced low-linolenic-acid mutant in McGregor flax (*Linum usitatissimum* L.). *Canadian Journal Plant Science*, 71: 393-396

UDC 633.521: 575.224.46.044

## CREATION OF NEW FORMS OF FLAX BASED ON THE METHOD OF INDUCED MUTAGENESIS

**K. Korolev**

*Tyumen State University, Russia, 625003, Tyumen, Volodarscogo, 6*

For the first time on flax used new chemical mutagens (nitrosoguanidine and fosfamid). On the basis of laboratory-field screening the features of mutational variability in collection samples and flax varieties were revealed. Mutant populations with phenotypic changes of practical interest were obtained.

**Key words:** mutagens, phosphemidum, chlorophyll, variability, cultivated plants, stress.

The creation of new varieties of flax is based on a variety of source material (collectible patterns, hybrid forms). One of the promising methods of selection is the method of induced mutagenesis, and first of all, chemical, which is confirmed by numerous studies (Ivashko, 1987, Korolev, 2013, 2016, 2017). In this regard, we first studied the effect of chemical mutagen nitrosoguanidine and fosfamida varieties and collection samples of flax. It is revealed that at high concentrations of chemical compounds there was a change of morphometric parameters of seedlings, germination energy and laboratory germination of seeds. It should be noted that the highest inhibitory effect in flax samples was observed at a concentration of 0.1%.

Field study of the resulting mutant populations of flax were conducted in the experimental field of the enterprise "Institute of flax" (Republic of Belarus) and the experimental plot of the "biological Station "Kuchak Lake" (Russian Federation) on sod-podzolic sandy loam soil with optimum agrochemical indicators.

Seed germination largely determines the further growth and development of plants. In studies found an ambiguous effect nitrosoguanidine and fosfamida on flax seeds. As you know (SIMAS, Queens, 2012) on the effect of the mutation is judged by changes in individual population characteristics.

In our studies revealed a stimulating effect on seed germination, plant height, weight of stalk and weight fiber low concentrations of chemical compounds with mutational effect. As a result of laboratory and field experiments, new data on the characteristics of mutational variability in collection samples and varieties of flax under the influence of chemical compounds were obtained. Selected populations with phenotypic changes that are of interest for further study.

#### References:

1. Ambreen, A. 2011. Cytological effect of ethyl methane sulphonate and sodium azide in (*Linum usitatissimum* L.). *International journal of plant, animal and environmental sciences*, 2(1): 70-75.
2. Bretagne-Sagnard, B. 1995. Induced albino mutations as a tool for genetic analysis and cell biology in flax (*Linum usitatissimum* L) *Journal of Experimental Botany*. 47 (295): 189-194.
3. Chantreau M., Grec S., Gutierrez L., Dalmais M. 2013. PT-Flax (phenotyping and TILLinG of flax): development of a flax (*Linum usitatissimum* L.) mutant population and TILLinG platform for forward and reverse genetics. *BMC Plant Biology*, 13:159.
4. Chantreau M., Portelette A., Dauwe R., Kiyoto S., Cronier D. 2014. Ectopic lignification in the flax lignified bast fiber1 mutant stem is associated with tissue-specific modifications in gene expression and cell wall composition. *The Plant Cell*, 26(11): 4462-4482. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.13044>.
5. Green, A., Marshall D. 1984. Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum* L.) having reduced linolenic acid content. *Euphytica*, 33: 321-328.
6. Green, A. 1986. A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil. *Canadian Journal Plant Science*, 66: 499-503.
7. Ivashko, L. 1988. The use of mutagenesis method in the selection of flax. *Chemical mutagenesis in the selection process*, 158-160. (in Russian).
8. Korolev K., Bome N., Abetova A. 2017. Mutation effect of nitrosoguanidine when exposed to flax varieties (*Linum usitatissimum* L.) of various ecological and geographical origins. *Tobolsk Scientific*, 84-87. (in Russian).
9. Kupyanskya, N. 1978. The effect of chemical mutagens on flax. *Breeding, seed growing and agrotechnics of flax cultivation*, 15: 3 - 5. (in Russian).
10. Rowland G. 1991. An EMS-induced low-linolenic-acid mutant in McGregor flax (*Linum usitatissimum* L.). *Canadian Journal Plant Science*, 71: 393-396

УДК 579.852.11

## СТИМУЛЯТОР РОСТА БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

Рыженков Н. С., Яценко Е. С., Ширманов М. В., Евдокимов И. Ю., Микушина И. В.  
Алтайский государственный университет, Барнаул, Россия  
656049, Барнаул, пр. Ленина, 61  
e-mail: mlprx@mail.ru

Получена питательная среда для культивирования бактерий *Bacillus subtilis*, содержащая пептон ферментативный, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, 40% спиртовой экстракт кровохлебки лекарственной и дистиллированную воду при заданном соотношении компонентов. Использование кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis*) в качестве стимулятора роста позволяет повысить численность микроорганизмов.

**Ключевые слова:** питательная среда, экстракт, стимулятор роста, *Bacillus subtilis*, *Sanguisorba officinalis*

Стимуляторы роста различных микроорганизмов, используемые для культивирования хорошо изучены на лабораторном и промышленном уровнях [1–4].

В работе использовали следующие штаммы: *Bacillus subtilis* B-12079, *B. subtilis* B-2895, *B. subtilis* B-2896, *B. subtilis* B-4828, *B. subtilis* B-1323 и *B. subtilis* B-5449. В качестве стимулятора роста был выбран 40% спирто-

вой экстракт кровохлебки лекарственной. Сбор растительного сырья осуществлялся в июне 2017 в Алтайском крае. Для культивирования использовали питательную среду следующего состава, г/л: дрожжевой экстракт – 5.0; пептон ферментативный – 15.0; хлорид натрия – 5.0; 40 % спиртовой экстракт кровохлебки – 20 мл/л и дистиллированная вода – до 1 л (рН 6.8–7.0). Стерилизацию проводили при давлении 1.1 атм. в течение 40 минут. Культивирование производили в шейкер-инкубаторе «Innova 44» при вращении 250 об/мин (эксцентриситет 5 см), температуре 37°C в течение 24 часов. Для определения численности использовали стандартный метод десятикратных разведений. Опыт проведен в семикратной повторности. В контрольную пробу экстракт не вносили.

В ходе эксперимента было выявлено что наибольший рост колоний наблюдался на среде с добавлением 20 мл/л 40% экстракта кровохлебки лекарственной (таб. 1).

Таблица 1. Результаты влияния 40% спиртового экстракта кровохлёбки на стимуляцию роста штаммов *B. subtilis*.

Штамм	Количество бактерий, (КОЕ*1010/мл) с добавления 40% спиртового экстракта	Количество бактерий (КОЕ*1010/мл) без добавления 40% спиртового экстракта
<i>B. subtilis</i> B-12079	2600 ±130	390±70
<i>B. subtilis</i> B-2896	1200±20	380±20
<i>B. subtilis</i> B-2895	1900±210	410±20
<i>B. subtilis</i> B-1323	742±20	310±30
<i>B. subtilis</i> B-4828	2850±190	360±30
<i>B. subtilis</i> B-5449	1285±190	302±20

Таким образом, использование 40% спиртового экстракта кровохлебки лекарственной в качестве стимулятора роста для культивирования различных штаммов бактерии *B. subtilis* позволяет увеличить численность жизнеспособных микроорганизмов в несколько раз.

#### Литература.

1. Адлова Г.П., Мельникова В.А., Смирнова Г.А., Арепьева А.А., Денисова С.В., Илidgeв А.К., Ратникова Т.Н. Разработка стимуляторов роста бактерий из растений // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1998. – № 1. – С. 13–17.
2. Баронец Н.Г. Получение стимуляторов роста микроорганизмов из лекарственных растений: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Москва, 2004. – 28 с.
3. Патент РФ № 2283347, 10.09.2006.
4. Котляров В. В., Сединина Н. В. Использование янтарной кислоты в биотехнологическом процессе получения препаратов *Pseudomonas fluorescens* // Научный журнал КубГАУ. – 2014. – № 101. – С. 2327–2336.

UDC 579.852.11

## STIMULATOR OF BACILLUS GROWTH BACILLUS SUBTILIS

Ryzhenkov N. S., Yatsenko E. S., Shirmanov M. V., Evdokimov I. Yu. Mikushina I. V.  
Altai State University, Barnaul, Russia  
656049, Barnaul, Lenin Str., 61  
e-mail: mlprx@mail.ru

The medium for stationary cultivation of bacteria of *Bacillus subtilis* containing a peptone enzymatic, yeast extract, sodium chloride, 40% spirit extract of a *Sanguisorba officinalis* and distilled water at the given ratio of components is received. Use of a *Sanguisorba officinalis* as a growth factor allows increasing the number of microorganisms.

**Key words:** nutrient medium, extract, stimulator of growth, *Bacillus subtilis*, *Sanguisorba officinalis*.

The growth factors of various microorganisms used for cultivation well studied at the laboratory and production levels [1–4].

In work used the following strains: *Bacillus subtilis* B-12079, *B. subtilis* B-2895, *B. subtilis* B-2896, *B. subtilis* B-4828, *B. subtilis* B-1323 and *B. subtilis* B-5449. As a growth factor spirit, extract of a *Sanguisorba officinalis* chosen as 40%. Collecting vegetable raw materials carried out in June 2017 in Altai Krai. For deep cultivation used a medium of the following structure, a g/l: yeast extract – 5.0; a peptone enzymatic – 15.0; Sodium chloride – 5.0; 40% spirit extract of a *Sanguisorba* – 20 ml/l and distilled water – up to 1 l (pH 6.8–7.0). Sterilization carried out with a pressure of 1.1 atm. within 40 minutes. Cultivation produced in a shaker incubator of “Innova 44” at rotation 250 rpm (an eccentricity of 5 cm), temperature of 37 °C within 24 clocks. For determination of number used a

standard method of tenfold cultivations. Experiment made in sevenfold frequency. In a check, extract not brought.

During the experiment, it revealed that the largest growth of colonies observed on the Wednesday with addition of 20 ml/l of 40% of extract of a *Sanguisorba officinalis* (table 1).

Table 1. Results of influence of 40% of spirit extract of a *Sanguisorba* for stimulation of growth of strains of *B. subtilis*.

Strain	The number of bacteria, (CFU * 1010 / ml) with the addition of 40% spirit extract	The number of bacteria, (CFU * 1010 / ml) without the addition of 40% spirit extract
<i>B. subtilis</i> B-12079	2600 ±130	390±70
<i>B. subtilis</i> B-2896	1200±20	380±20
<i>B. subtilis</i> B-2895	1900±210	410±20
<i>B. subtilis</i> B-1323	742±30	310±30
<i>B. subtilis</i> B-4828	2850±190	360±30
<i>B. subtilis</i> B-5449	1285±190	302±20

Thus, the use of 40% spirit extract of the *Sanguisorba officinalis* as a growth stimulant for the cultivation of different strains of the *B. subtilis* bacterium makes it possible to increase the number of viable microorganisms several times.

#### References.

- Adlova G. P., Melnikova V. A., Smirnova G. A., Arepyeva A. A., Denisova S. V., Ilidzhev A. K., Ratnikova T. N. Development of stimulator of growth of bacteria from plants // the Magazine of a microbiology, epidemiology and immunobiology. – 1998. – № 1. – P. 13-17.
- Baronets N. G. Obtaining growth stimulators of microorganisms of medicinal plants: Autoref. – Moscow, 2004. – 28 pages.
- Patent of the Russian Federation № 2283347, 10.09.2006.
- Kotlyarov V. V., Sedinina N. V. Use of succinic acid in biotechnological process of receiving the medicines *Pseudomonas fluorescens* // the Scientific magazine of KubGAU. – 2014. – № 101. – P. 2327-2336.

УДК 581.192.7:63

## СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ «СИМБИОНТ»

**Таразанова Т.В.**

ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия.

127550, город Москва, Тимирязевская улица, д. 49.

E-mail: tarazan777@rambler.ru

Биопрепараты «Симбионт» являются стимуляторами роста. Препараты обладают широким действием - повышают урожай сельскохозяйственных культур и улучшают его качество, поддерживают иммунитет растений. Их действие косвенно отражается на плодородии почв.

**Ключевые слова:** стимуляторы роста, «Симбионт», урожайность сельскохозяйственных культур, качество урожая.

Начатые исследования Ф.Ю. Гельцер [1] по синтезу и применению стимуляторов роста «Симбионт» в настоящее время непрерывно продолжаются нами - ее прямыми учениками. Создан набор биопрепаратов. Усовершенствован их синтез со значительными изменениями в методике, расширены условия применения и уточнены расходные нормы для разных сельскохозяйственных культур. Выявлено влияние биопрепаратов на формирование урожая возделываемых культур и его качество.

Биопрепараты «Симбионт» являются стимуляторами роста. «Симбионт» содержит набор многих ферментов, физиологически активных веществ, фитогормонов, которые продуцируют эндофиты растений. Стимулирующее действие «Симбионта» направлено на прорастание семян с максимальным эффектом последствия на протяжении вегетационного периода. «Симбионт» в обработанных им семенах на уровне гормональной сигнализации, мгновенно воздействует на сигнальные белки мембран клеток семенной оболочки и клеток семян, на рецепторы, G-белки цитоплазмы, кальциевые мессенджеры, ферменты гидролиза и синтеза, усиливает их каталитическую активность. В результате такого целенаправленного

влияния биопрепаратов на состояние семян, происходит стремительное пробуждение к развитию зародыша семян, которое одновременно протекает с процессом набухания. Временной интервал прорастания сокращается на 1 – 3 суток. Ростки формируют мощную корневую систему, закладывают боковые корни 2 - 4 порядков. Этим значительно увеличивается объем общей поглощающей поверхности корней развивающихся растений, которые способны сформировать утолщенный стебель и развитые листья. Возрастает интенсивность процессов фотосинтеза и дыхания растений. В результате «Симбионт» увеличивает урожайность сельскохозяйственных культур на 10 – 20% в полеводстве, а в условиях закрытого грунта – до 50%. Действие стимуляторов сохраняется и на протяжении вегетационного периода. Отмечено повышение иммунитета и устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды. Качество урожая улучшается за счет увеличения концентрации белков, сахаров, крахмала, жиров, сухого вещества и других веществ, и снижения концентрации нитратов и редуцирующих сахаров в товарной части продукции.

Хорошо развитые культурные растения на протяжении вегетационного периода поддерживают нормальные условия жизнедеятельности почвенных микроорганизмов, микоризных грибов, симбиотических грибов, которые участвуют в обеспечении растений влагой и необходимыми элементами питания, а продукты их жизнедеятельности и образованная ими в почве и на ее поверхности мицелиарная сеть, способствуют склеиванию микроагрегатов в водопрочные, формированию структуры, улучшению пористости и аэрации пахотного слоя почвы.

Взаимосвязь почва – растения участвует в формировании урожая возделываемых культур и его качества, способствует сохранению плодородия пахотных почв.

Литература:

1. Гельцер Ф.Ю. Симбиоз с микроорганизмами – основа жизни растений – М.: Изд-во МСХА, 1990. 134 с.

УДК 581.192.7:63

## STIMULATORS OF PLANT GROW “SYMBIONT”

**Tarazonova T.V.**

*Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RSAU-MTAA)  
Moscow, Russia  
127550, Timiryazevskayast., 49  
E-mail: tarazan777@rambler.ru*

Biological extracts “Symbiont” are stimulators of plant growth. Such biological substances have a wide range of effects: they increase the yield of agricultural crops, improve crop quality, and support the immunity of plants. Indirectly such biological extracts affect the soil fertility.

**Key words:** growth stimulators, “Symbiont”, yield of agricultural crops, crop quality.

The research begun by F.Geltser [1] is continued by us, her direct disciples, in the field of “synthesis” and the use of growth stimulators “Symbiont”. We created a set of samples of biological growth stimulator. Its synthesis was improved with significant changes in the methodology. Furthermore, the application conditions were expanded and the application dosages for various agricultural crops were specified. We also determined the impact of these biological extracts on the formation of a crop of the cultivated plants and crop quality.

Biological extracts “Symbiont” are the stimulators of plant growth. “Symbiont” comprises of many enzymes, physiologically active substances, phytohormones. All those components are synthesized by endophytes of plants. The stimulating growth effect of “Symbiont” is directed to the initial stage of seeds’ germination with the maximum action of aftereffect during the vegetative period. In the seeds treated with “Symbiont” at the level of hormone signaling, bioactive compounds of “Symbiont” instantly affect the signaling proteins of the membranes of both the seed coat cells and seed cells, also affect receptors, cytoplasm G-proteins, calcium messengers, enhance the catalytic activity of enzymes responsible for hydrolysis and synthesis. As a result of such biological extract impact on the state of the seeds, the seed germ goes through an accelerated development, which simultaneously proceeds with its swelling. The germination time reduces by 1-3 days. Seedlings form a strong root system and create the lateral roots of 2 - 4 orders of magnitude. This significantly increases the amount of the total root surface of growing plants and allows to form a thicker stem and larger leaves. This would enhance photosynthesis and plant respiration. “Symbiont” increases the yield of agricultural crops grown in the field by 10 - 20% and greenhouses – by about 50%. Furthermore, the activity of growth stimulators remains during the whole vegetative season. We also

noted increased immunity and resistance of plants to adverse environmental factors. The crop quality significantly improved due to the increased concentration of proteins, sugars, starch, fats, dry matter and other substances, and due to the reduced concentration of nitrates and reducing sugars in the commercial part of the crops.

Well-developed agricultural plants during its whole growth period maintain optimal life conditions for soil microorganisms, mycorrhizal and symbiotic fungi. In turn the soil bacteria and the fungi provide the plants with moisture and necessary nutritional elements and form the micellar network in the soil and on its surface. The soil micellar networks as well as the products of vital activity of soil bacteria and fungi promote the strong gluing of soil particles into waterproof microaggregates, the formation of soil structure, improves the soil porosity and aeration of the arable layer.

Soil-plant interactions are involved in the yield formation of crops of cultivated plants and crop quality, and contribute to the fertility conservation of arable soils.

*References:*

1. F.Y. Geltser. *Symbiosis with microorganisms is the basis of plant life*. - Moscow: RSAU-MTAA Publishing House, 1990. - 134 p. - ISBN 5-7230-0037-3.

УДК 606

## ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА В КОРНЯХ ХРЕНА ОБЫКНОВЕННОГО (*ARMORACIA RUSTICANA*)

Мартирисян Л.Ю.<sup>3</sup>, Сазыкин А.Ю.<sup>1</sup>, Дядищева Т.Р.<sup>1</sup>, Мартирисян В.В.<sup>1</sup>, Топорова В.А.<sup>2</sup>, Алиев Т.К.<sup>2</sup>, Мартирисян Ю.Ц.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия, 127422, Москва, ул. Тимирязевская, 42

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>3</sup> ФГБНУ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия 119334, Москва, ул. Косыгина, д. 4  
e-mail: yumart@yandex.ru

Показана возможность экспрессии рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека в корнях *Armoracia rusticana*.

**Ключевые слова:** бутирилхолинэстераза, транзистентная экспрессия.

Бутирилхолинэстераза (BuChE) и ацетилхолинэстераза являются двумя ферментами ответственными за гидролиз ацетилхолина. Бутирилхолинэстераза обладает способностью нейтрализовать ряд разнообразных токсинов, оказывающих ингибирующее действие на ацетилхолинэстеразу. Это свойство фермента позволяет использовать его в медицинской практике как биологический антидот, действие которого направлено на различные фосфорорганические токсины. BuChE обнаруживается почти во всех тканях человека – в легких, кишечнике, печени, в сыворотке крови. В 2006 году бутирилхолинэстераза человека от FDA, USA, получила статус «New development drug». Бутирилхолинэстераза является субъединичным ферментом. Это гликопротеид, состоящий из четырех субъединиц. Каждая субъединица состоит из 574 аминокислот и 9 полисахаридных цепей. Молекулярная масса одной субъединицы составляет 85 кД. В настоящее время бутирилхолинэстеразу человека получают из донорской крови. Это не позволяет производить препарат в больших количествах и делает его очень дорогостоящим и труднодоступным. Таким образом, получение рекомбинантных препаратов BuChE весьма актуально. Так как фермент является гликопротеидом, использовать для его получения бактериальную систему экспрессии невозможно. Удачная система экспрессии рекомбинантной бутирилхолинэстеразы была разработана в клетках CHO- Chinese hamster ovary cells (2). Однако выращивание культуры клеток животных также достаточно дорогостоящая процедура. В трансгенных растениях ген BuChE был экспрессирован в табаке.

В настоящей работе бутирилхолинэстераза была экспрессирована в корнях растения хрена (*Armoracia rusticana*), способом транзистентной экспрессии (transient expression). При транзистентной экспрессии происходит непродолжительная экспрессия клонируемого гена, введенного трансфекцией в организм хозяина, при этом интегрирования в геном клетки-хозяина экзогенного гена не происходит, количество копий гена снижается по мере деления клеток хозяина, что приводит к снижению уровня продукта этого гена в организме. Метод транзистентной экспрессии используется для оценки возможности функционирования изуча-

емой геной конструкции в организме хозяина.

Для трансфекции корней хрена была использована *Agrobacter rhizogenes*, несущая в себе векторную плазмиду, содержащую ген бутирилхолинэстеразы человека, рВ1121-BuChE. В экспрессионный вектор Рb121 был клонирован ген бутирилхолинэстеразы человека, содержащий последовательности, кодирующие лидерный пептид (на 5'-конце) и искусственную последовательность SEKDEL на 3'-конце непосредственно перед стоп-кодоном (усиливает транспорт в ретикулум). Встраивание производили по сайтам узнавания рестриктаз XbaI и SacI, вместо гена β-глюкуронидазы GUS. В середине гена с помощью SOE-PCR был удален дополнительный сайт узнавания XbaI, что упрощало конструкцию. Ген BuChE поставлен под контроль сильного конститутивного промотора вируса мозаики цветной капусты CaMV 35S и терминатора гена нопалинсинтазы NOS и сигнала полиаденилирования polyA. Предполагалось, что в результате экспрессии гена будет получена секреторная форма BuChE. Плазмида рВ1121-BuChE была трансформирована в *Agrobacter rhizogenes* при помощи электропарации. Полученный рекомбинантный штамм выращивали при 28°C в течение 48 часов на среде LB, содержащей 50 мг/мл канамицина, на качалке, при 270 об/мин., до О.Д. 1,5. Корни молодых растений хрена инкубировали 60 мин. в полученной суспензии клеток *Agrobacter rhizogenes* и помещали в установку для аэропонного выращивания растений. Через 10 дней роста образцы корней весом 1-2 г обрезали, гомогенизировали при помощи баллатин. Остатки клеток и баллатины удаляли центрифугированием при 5000g. В супернатанте определяли активность бутирилхолинэстеразы. Определение активности проводили при помощи цветной реакции (2). Реакцию проводили в 96-луночных планшетах. В лунки планшета помещали 50 мкл экстракта корней и добавляли 100 мкл раствора 50-мкм дитионитробензойной кислоты, 100 мкм бутирилтиохолиндида в 100мМ фосфатном буфере, рН 8,0. Окраска появлялась при комнатной температуре за 1-5 минут. Измерения проводили при 405 нм. В качестве положительного контроля использовали препарат рекомбинантной бутирилхолинэстеразы из клеток СНО, любезно предоставленный А.Г. Габибовым. В качестве отрицательного контроля использовали экстракт корней интактных растений хрена. В лунках, содержащих экстракты корней трансформированных растений, О. Д. составляла 1,5-2,0 О.Е., в лунках, содержащих экстракты корней интактных растений, О.Д. не превышала 0,05 О.Е. Через 1-2 месяца после трансформации растений хрена, по мере роста размера и массы корней, активность BuChE в экстрактах корней исчезала.

Таким образом, показана возможность экспрессии рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека в корнях *Armoracia rusticana*. Для получения препарата бутирилхолинэстеразы, однако, необходимо введение гена целевого продукта непосредственно в геном растения.

#### Литература:

1. A.D. Wolfe, R.S. Rush, B.P. Doctor, I. Koplovitz, D. Jones. *Acetylcholinesterase prophylaxis against organophosphate toxic// Fundam. Appl. Toxicol*, 9 (1987), 266-270.
2. Д.Г. Илюшин, О.М. Эртле, Т.В. Бобик, О.Г. Шамборант, Е.А. Сурина, В.Д. Кноппе, Р. Массон, И.В. Смирнов, А.Г. Габибов, Н.А. Пономаренко. Рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека как биологический антидот нового поколения: разработка эукариотической системы экспрессии // *Acta Naturae*, том 5, №1 (16) 2013, 76-88.

UDC 606

## TRANSIENT EXPRESSION OF HUMAN BUTYRYLCHOLINESTERASE IN THE ROOTS OF HORSE RADISH (*ARMORACIA RUSTICANA*)

Martirosyan, L. Y<sup>1,3</sup>., Sazykin, A. Y<sup>1</sup>., Dyadisheva T. R<sup>1</sup>., Martirosyan V. V<sup>1</sup>., Toporova V. A<sup>2</sup>., Aliev T. K<sup>2</sup>., Martirosyan Y. C<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127422, Moscow, Timiryazevskaya St., 42.

<sup>2</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya Str., 16/10, Moscow, 117997, Russia.

<sup>3</sup> N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS (IBCP RAS)  
e-mail: yumart@yandex.ru

The possibility of expression of human recombinant butyrylcholinesterase in the roots of *Armoracia rusticana* has been demonstrated.

**Key words:** butyrylcholinesterase, transient expression.

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) are two different cholinesterase enzymes that are responsible for acetylcholine hydrolysis. Butyrylcholinesterase has the ability to neutralize variety of toxins



that inhibit acetylcholinesterase. This property of the BuChE allows its use in medicine as a natural antidote for organophosphate poisoning. The BuChE is found in almost all human tissues, including lungs, intestines, liver, and blood serum. The human BuChE has received a status of a "New development drug" from the FDA in 2006.

Human butyrylcholinesterase is a glycoprotein composed of four identical subunits. Each subunit consists of 574 amino acid residues and 9 polysaccharide chains. The molecular weight of a BuChE subunit is 85 kDa.

Currently, the human butyrylcholinesterase is produced from donor blood. This makes the manufacturing of large amounts difficult, and the production cost is very high. Therefore, the production of recombinant BuChE is very important. However this enzyme is a glycoprotein, and the bacterial expression systems can't be used for its production. A successful system for the expression of recombinant BuChE was developed in Chinese hamster ovary cells (2). However, this process is quite expensive as well. In transgenic plants, the BuChE gene was expressed in tobacco. In this work, a butyrylcholinesterase was transiently expressed in the roots of the horseradish plant (*Armoracia rusticana*). Since the cloned gene is not integrated into the host genome during transient expression, the numbers of copies of the introduced gene decreases with each host cell division, which leads to a decrease in the level of gene expression. The method of transient expression is used to assess the possibility of functioning of the studied gene structure in the host organism.

We have used *Agrobacterium rhizogenes* plasmid based vector, containing the human butyrylcholinesterase gene, pBI121-BuChE, for transfection of horseradish roots. The sequences encoding the human butyrylcholinesterase with leader peptide (in the 5' end) and the artificial SEKDEL sequence at the 3' end, just before the stop codon (enhances transport to the reticulum), were cloned into the pBI121 expression vector at the endonucleases XbaI and SacI recognition sites, thus replacing the  $\beta$ -glucuronidase gene GUS. To simplify the cloning in the middle of the gene, the second XbaI recognition site was removed using SOE-PCR. The BuChE gene is placed under the control of the strong constitutive promoter of cauliflower mosaic virus CaMV 35S, the NOS nopaline synthase gene terminator and the polyA polyadenylation signal. As a result of gene expression, a secretion BuChE is expected.

The *Agrobacterium rhizogenes* was transformed with pBI121-BuChE expression vector by electroporation. The transformed *Agrobacterium* cells were incubated for 48 hours at 28°C in LB medium containing 50 mg / ml kanamycin, on a shaker, at 270 rpm, to O.D. 1.5. The roots of young horseradish plants were incubated for 60 minutes in the resulting suspension of *Agrobacterium rhizogenes* cells before placing in aeroponics system for growth. After 10 days of growth, roots weighing 1-2 g were cut and homogenized using ballatin. The residues of cells and ballatin were removed by centrifugation at 5000g. The activity of butyrylcholinesterase was measured in the supernatant. A colorimetric reaction was used for determination of the enzyme activity in the roots (2). The reaction was carried out in 96-well plates. The root extract (50  $\mu$ l) was mixed with 100  $\mu$ l of 50  $\mu$ M dithionitrobenzoic acid and 100  $\mu$ M butyrylthiocholine iodide in mM phosphate buffer, pH 8.0. The samples were incubated at room temperature for 1-5 minutes. The measurements were performed on at a wavelength of 405 nm. As a positive control, recombinant butyrylcholinesterase from CHO cells was used, kindly provided by A.G. Gabibov. As a negative control, the root extract of intact horseradish plants was used. In the wells containing the extracts of the roots of transformed plants, O.D. was 1.5-2.0 OE, in wells containing root extracts of intact plants, O.D. did not exceed 0.05 OE. 1-2 months after the transformation of the horseradish plants, as the size and weight of the roots grew, the activity of BuChE in root extracts disappeared.

Thus, the possibility of expression of human recombinant butyrylcholinesterase in the roots of *Armoracia rusticana* has been demonstrated. For the preparation of butyrylcholinesterase, however, it is necessary to introduce the gene of the desired product directly into the genome of the plant.

#### References:

1. A.D. Wolfe, R.S. Rush, B.P. Doctor, I. Kopolovitz, D. Jones. *Acetylcholinesterase prophylaxis against organophosphate toxicity*// *Fundam. Appl. Toxicol.* 1987. №9. 1987. 266-270.
2. Ilyushin DG1, Haertley OM, Bobik TV, Shamborant OG, Surina EA, Knorre VD, Masson P, Smirnov IV, Gabibov AG, Ponomarenko NA. *Recombinant human butyrylcholinesterase as a new-age bioscavenger drug: development of the expression system*// *Acta Naturae.* V. 5, №1 (16) 2013.-76-88.

УДК 581. 522.4

## ФОРМИРОВАНИЕ ЗАЩИТНЫХ МЕХАНИЗМОВ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ В ОТВЕТ НА КРАТКОВРЕМЕННУЮ ОБРАБОТКУ БРАССИНОСТЕРОИДАМИ ПРИ ХЛОРИДНОМ ЗАСОЛЕНИИ

Ефимова М.В., Бойко Е.В., Ковтун И.С., Кузнецов В.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия  
634060, г. Томск, пр. Ленина, 36.  
E-mail: stevmv555@gmail.com

Защитное действие brassinosterоидов при хлоридном засолении определяется не только химической структурой соединения, но и способом воздействия на растения.

**Ключевые слова:** *Solanum tuberosum* L., хлоридное засоление, brassinosterоиды.

*Solanum tuberosum* L. (картофель) является ценной продовольственной культурой, агропромышленное выращивание которой представляет значительный интерес. В настоящее время около одной трети всех почв земного шара засолено. Это приводит к существенному сокращению площади пахотных земель. Отсутствие достаточно эффективных и экологически чистых способов снижения засоленности территорий накладывает существенные ограничения на продуктивность сельскохозяйственных культур растений [1]. В связи с этим, представляется перспективным использование технологий повышения устойчивости растений к действию абиотических факторов с использованием экологически безопасных веществ природного происхождения – фитогормонов, в частности – brassinosterоидов (БС). Протекторный эффект brassinosterоидов характеризуется высокой степенью вариабельности и зависит от химической структуры гормона, его концентрации, продолжительности воздействия и способа обработки растения.

подавляющее большинство исследований направлено на изучение протекторных механизмов действия БС в условиях стресса [2, 3]. В данной работе оценивали защитный эффект стероидных гормонов после 4-х часовой обработки растений *S. tuberosum*. Обработанные гормонами растения помещали в питательную среду в отсутствие (контрольный вариант) или в присутствии 100 мМ NaCl (опытные варианты). Через 6 суток оценивали морфометрические показатели; часть растительного материала фиксировали в жидком азоте для снятия физиологических показателей. Учитывали накопление сырой и сухой биомассы, линейные размеры побега и корня, площадь листовой поверхности, количество столонов, содержание фотосинтетических пигментов, интенсивность осмотического и окислительного стрессов. Анализируемые brassinosterоиды отличались как по количеству атомов углерода в молекуле – С28 (24-эпибрассинолид) и С29 (28-гомобрассинолид), так и по конфигурации заместителей в боковой цепи – 24R-метил (24-эпибрассинолид) и 24S-этил (28-гомобрассинолид). Диапазон анализируемых концентраций гормонов составлял 10<sup>-11</sup>-10<sup>-8</sup> М. Подробное описание методической части приведено в статье М.В. Ефимовой и др. [3].

Было показано, что кратковременная обработка двумя разными по структуре brassinosterоидами значительно снижала негативное влияние соли на морфометрические показатели растений картофеля (в особенности, на количество столонов), способствовала уменьшению интенсивности перекисного окисления липидов, а также увеличению содержания пролина и каротиноидов – важных элементов антиоксидантной системы защиты растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 16-16-04057.

### Литература:

1. Ефимова М.В., Савчук А.Л., Хасан Дж А.К., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса brassinosterоидами // Физиология растений, 2014, том 61, № 6. С. 778-789.
2. Fariduddin Q., Yusuf M., Ahmad I., Ahmad A. Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses // Biol. Plant. 2014. V. 58. P. 9–17.
3. Ефимова М.В., Хрипач В.А., Бойко Е. В., Малофий М.К., Коломейчук Л.В., Мурган О.К., Видершпан А.Н., Мухаматдинова Е.А., Кузнецов Вл.В. Индуцированный brassinosterоидами прайминг растений картофеля снижает окислительный стресс и повышает солеустойчивость // Доклады академии наук. Общая биология, 2018, №6 (478).

UDC 581. 522.4

## SALT TOLERANCE IN POTATO PLANTS INDUCED BY SHORT-TERM BRASSINOSTEROID TREATMENT

Efimova M.V., Boyko E.V., Kovtun I.S. Kuznetsov V.V.

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation  
634050, Tomsk, Lenin av., 36.  
E-mail: stevmv555@gmail.com

Protect effect of the brassinosteroids in plants under salt stress conditions is determined not only by compound chemical structure, but by the treatment way.

**Key words:** *Solanum tuberosum* L., salt stress, brassinosteroids.

*Solanum tuberosum* L. (potato) is a valuable agricultural crop, industrial cultivation of which has a great interest. At present, about one-third of all soils of the globe are saline. It leads a significant reduce of the arable soil area. Lack of the effective and ecological safe methods of reducing soil salinity make a significant limitation on productivity of crop [1]. Because of it using the technologies of increase plant resistant are very perspective way of science research. Plant steroid hormones – brassinosteroids – are very perspective in this way. Protection effect of brassinosteroids is characterized by high variable level and depends on hormone chemical structure, its concentration, duration and way of treatment.

A great part of researches are directed to investigate of protective mechanisms of brassinosteroids during stress [2, 3]. In this research protective effect of steroid hormones after four hours treatment of *S. tuberosum* was estimated. Hormone-treated plants were placed in a culture medium without (control) or with 100 mM NaCl (sample). In 6 days the morphometric parameter of plants were estimated; a part of plant material was fixed in liquid nitrogen for analysis of physiological parameters. The accumulation of wet and dry weight, liner dimensions of shoots, roots, leaf surface area, number of stolons, photosynthetic pigment content, osmotic and oxidative stress intensity was taken into account. Analyzed brassinosteroids differed in the number of carbon atoms in the molecule – C 28 (24 - epibrassinolide), C29 (28 - homobrassinolide), and also by the configuration of substituents in the side chain – 24R – metil (24 - epibrassinolide) and 24S – etil (28 - homobrassinolide). The range of analyzed concentrations of hormones was 10<sup>-11</sup>-10<sup>-8</sup> M. Methodical description is given in the article of M.V. Efimova et al. [3].

Thus, it was shown that, the short term pretreatment by two structurally different brassinosteroids significantly decrease the negative influence of the salt stress on potato morphometric parameters (especially at the quantity of stolons), contributed to a decrease of peroxidation intensity of lipids and also increase of proline and carotinoids content – important elements for function of plant antioxidation protect systems.

The research was supported by a grant from the Russian Science Foundation 16-16-04057.

### References:

1. Efimova M.V., Savchuk A.L., Hasan J.A.K., Litvinvskaya R.P., Khripach V.A., Kholodova V.P., Kuznetsov V.V. *Physiological mechanisms of enhancing salt tolerance of oilseed rape plants with brassinosteroids // Russian Journal of Plant Physiology*, 2014, V. 61, № 6, P. 778-789.
2. Fariduddin Q., Yusuf M., Ahmad I., Ahmad A. *Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses // Biol. Plant*. 2014. V. 58. P. 9–17.
3. M.V. Efimova, V.A. Khripach, E.V. Boyko, M.K. Malofiy, L.V. Kolomeychuk, O.K. Murgan, A.N. Vidershpan, E.A. Muhamatdinova, V.V. Kuznetsov. *The priming of potato plants induced by brassinosteroids reduces oxidative stress and increases salt tolerance // Doklady Biological Sciences*, 2018, №6 (478).

## СЦЕНАРИИ ПЕРЕХОДА К НОВОМУ СЕЛЬСКОМУ ХОЗЯЙСТВУ И ФУНКЦИОНАЛЬНОМУ ПИТАНИЮ: В ПОИСКАХ ПУТЕЙ РЕАЛИЗАЦИИ ПРИОРИТЕТА НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ РФ

### TRANSITION SCENARIOS TO NEW AGRICULTURE AND SMART FOOD: IN SEARCH OF WAYS OF REALISATION OF PRIORITIES IN SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL POLITICS OF RUSSIAN FEDERATION

1. ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В РАЗРАБОТКЕ СОВРЕМЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ, Кустикова О.В., Малоголовкин А.С., Середа А.Д., Федорова В.А. ....	849
MAIN TRENDS IN DEVELOPMENT OF NOVEL CHEMICAL AND BIOLOGICAL LIVESTOCK-PROTECTING AGENTS, Kustikova O.V., Malogolovkin A.S., Sereda A.D., Fjodorova V.A. ....	850
2. ПЕРЕРАБОТКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ОТХОДОВ В РОССИИ. ВЫЗОВЫ, ДРАЙВЕРЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ, Волчок А.А. ....	851
PROCESSING OF AGRICULTURAL RAW MATERIALS AND WASTES IN RUSSIA. CHALLENGES, DRIVERS, PERSPECTIVES, Volchok A.A. ....	852
3. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ С АДАПТОГЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОЛИЗАТОВ МИДИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА ИСКУССТВЕННЫХ НОСИТЕЛЯХ В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ, Гершунская В.В., Абрамова Л.С., Арнаутов М.В. ....	853
PERSPECTIVES FOR TECHNOLOGY DEVELOPMENT OF SPECIALIZED FOOD PRODUCTS WITH ADOPTOGENIC PROPERTIES, BASED ON ENZYMIC HYDROLYZATES WHICH ARE PRODUCED FROM AQUACULTURE MUSSELS FARMED ON ARTIFICIAL SUBSTRATES, Gershunskaya V.V., Abramova L.S., Arnavtov M.V. ....	854

УДК 615.1:619

## ОСНОВНЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В РАЗРАБОТКЕ СОВРЕМЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

**Кустикова О.В., Малоголовкин А.С., Середа А.Д., Федорова В.А.**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», пос. Вольгинский, Россия  
443013, г. Самара, ул. Магнитогорская, 8, o\_v\_kus@mail.ru

**Ключевые слова:** сельское хозяйство, вакцины, лекарственные средства, пробиотики

В настоящее время мы становимся свидетелями развития химии, проникающей во все области сельского хозяйства. Человек синтезирует и использует множество химических веществ — лекарства, регуляторы роста растений и животных и др. Большое внимание уделяется также разработке и производству биологических препаратов. Рациональное использование этих средств в ветеринарии позволит перейти на новый уровень ведения сельского хозяйства.

На сегодняшний день, в результате развития вакцинологии и вакцинопрофилактики практически ликвидирована или контролируется заболеваемость большинством острых социально значимых инфекций животных.

Для создания перспективных вакцин предполагается разработка, совершенствование и внедрение эффективных технологий:

- Разработки методов и критериев комплексной оценки кандидатных вакцин по безопасности, протективности, действующим механизмам иммунитета и риска развития поствакцинальных осложнений;
- Разработки живых рекомбинантных вакцин;
- Создания вакцин перорального применения для массовой вакцинации животных.

Для ряда вирусных болезней профилактическая вакцинация, не эффективна и не будет эффективна в обозримом будущем. В таких случаях применение химиотерапевтических препаратов может спасти ситуацию и дать возможность избежать катастрофических потерь продукции животноводства.

Для создания новых противовирусных и антимикробных мишень-направленных лекарственных средств необходимы: разработка противовирусных препаратов широкого спектра действия; поиск новых препаратов, действующих на сигнальные системы клеток; получение новых рекомбинантных белков противовирусной защиты клеток, имеющих реальные преимущества по сравнению с интерферонами; использование компьютерных подходов для разработки стратегии выбора видоспецифических белков-мишеней для лечения широкого спектра хронических заболеваний; выработка стратегии, основанной на использовании компьютерных подходов, поиска прототипов лекарств нового поколения; применение «незнакомых» для микроорганизмов, не встречающихся в природе противомикробных средств; химическая модификация природных антимикробных средств; использование синтетических противомикробных средств, против которых у бактерий нет механизмов устойчивости.

За последние годы производство и применение антибиотиков в кормлении животных и птицы в мире росло высокими темпами. Доказано, что устойчивые к антибиотикам микроорганизмы могут передаваться от животного к человеку.

Новые штаммы антибиотикоустойчивых бактерий способны появляться примерно каждые 2-3 года. На разработку же нового антибиотика биоиндустрия затрачивает существенно больше времени. Так, на испытание нового лекарственного препарата уходит около 5 лет.

В настоящее время во всем мире, включая Россию, усиленно ведется поиск альтернативных путей замены антибиотиков в животноводстве. Одним из реальных направлений являются пробиотики. Наиболее эффективными и перспективными на рынке кормовых добавок для животноводства, по нашему мнению, являются пробиотики на основе штаммов бактерий *B. subtilis* и *B. Licheniformis*. Применение указанных пробиотиков в хозяйствах и птицефабриках позволяет: существенно повысить естественную резистентность организма, сохранить на высоком уровне иммунный статус и снизить риск возникновения инфекционных заболеваний животных и птицы, обеспечить профилактику, ликвидировать или свести к минимуму хронические заболевания, повысить эффективность вакцинаций в 2-3 раза.

#### Литература:

1. Mikszo J. A., Laurent P. *Cutaneous delivery of prophylactic and therapeutic vaccines: historical perspective and future outlook*. *Expert Rev. // Vaccines*. — 2008. — V. 7. — P 1329-1339.
2. Plotkin S. A., Orenstein WA, Offit P A. *Vaccines*. — Saunders, Elsevier, 2008.
3. Логунов Д. Ю., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л. *Молекулярно-биотехнологические защиты от патогенов // Ремедиум*. — 2007. — № 3. — С. 20-23.

UDC 615.1:619

## MAIN TRENDS IN DEVELOPMENT OF NOVEL CHEMICAL AND BIOLOGICAL LIVESTOCK-PROTECTING AGENTS

**Kustikova O.V., Malogolovkin A.S., Sereda A.D., Fjodorova V.A.**

*Federal Research Center for Virology and Microbiology Federal State Budgetary Scientific Institution, Vol'ginskij township, Russia 443013, Samara, Magnitogorskaja str., 8, o\_v\_kus@mail.ru*

**Key words:** agriculture, vaccines, drugs, probiotics

Nowadays, we are witnessing the development of chemistry that enters all fields of agriculture. Humankind synthesizes and uses a plenty of chemical substances, e.g. drugs, plant and animal growth regulators etc. Development and manufacture of biological drugs is also an area of a particular interest. Efficient use thereof in veterinary science enables an upgrade of farming.

Currently, the improvements in vaccinology and vaccination made it possible to eliminate or control most of acute socially significant animal diseases.

Creation of advantageous vaccines requires development, improvement and implementation of following technologies:

- Methods and criteria for integrative evaluation of candidate vaccines considering their safety, protective efficacy, immunity mechanisms being used and risk of post-vaccination complications;
- live recombinant vaccines;
- oral vaccines for a mass vaccination of animals.

Preventive vaccination is inefficient and will not be efficient in foreseeable future for a number of viral diseases. In these cases, chemotherapy can save the situation and allow avoiding critical losses in animal husbandry.

Creation of novel antivirals and targeted antimicrobial drugs requires: development of broad-spectrum antivirals; seeking for novel drugs affecting signal pathways; development of novel recombinant proteins involved in antiviral protection and possessing real advantages vs. interferons; use of computer-based approaches to develop the strategies for choice of species-specific target proteins for treatment of a broad spectrum of chronic diseases; formulation of a computer-based strategy to seek for new generation drug prototypes; use of unnatural antimicrobial drugs which are "unknown" for microorganisms; chemical modification of natural antimicrobial drugs; use of synthetic antimicrobials which the bacteria have no resistance to.

In last years, manufacture and use of antibiotics as feed additives for livestock and poultry have been expanding at a fast rate. It has been proven that antibiotic-resistant microorganisms can be passed for animals to humans.

New antibiotic-resistant bacterial strains can appear in approximately 2-3 years. At the same time, development of a novel antibiotic requires much more time. Thus, the trial of novel drug lasts up to 5 years.

At present, all countries including Russia are seeking for alternatives to antibiotics in animal husbandry. Probiotics represent one of promising approaches thereto. We believe that the most efficient probiotic feed additives are based on *B. subtilis* and *B. licheniformis* strains. Use of these probiotics in holdings and poultry plants significantly increases natural resistance, maintains high immune status of animals, decreases the risk of infection diseases in livestock and poultry, enables prophylaxis thereof, eliminates or minimizes chronic diseases, and provides 2-3-fold vaccination efficacy.

УДК 604, 606

## ПЕРЕРАБОТКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ОТХОДОВ В РОССИИ. ВЫЗОВЫ, ДРАЙВЕРЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

Волчок А.А.

Ассоциация «Технологическая Платформа БиоТех2030»

Г. Москва, РФ

119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2. E-mail: [nanka-net@mail.ru](mailto:nanka-net@mail.ru)

Переход к новому сельскому хозяйству в стране сегодня предполагает своевременное развитие множества сфер, составляющих АПК России. Один из крупных сегментов, неразрывно связанных с сельским хозяйством – сектор хранения и переработки сельскохозяйственного сырья и продукции.

**Ключевые слова:** переработка биомассы, переработка отходов, биокатализ, биотехнологии, развитие научно-технической сферы, точки роста, рынок инноваций

Направление глубокой переработки сельскохозяйственного сырья и отходов в современном агропромышленном комплексе России складывается сегодня из широкого спектра технологий, нацеленных на переработку как растительной биомассы, так и субпродуктов животноводства и рыбоводства, а также технологий рециклинга и утилизации различных отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Технологии и подходы, нацеленные на максимально эффективное использование биомассы, в последние годы получили широкое распространение в развитых странах мира в связи с явными преимуществами их использования. Во-первых, новые разработки в данной сфере позволяют получать из растительного сырья и субпродуктов животного происхождения множество ценных продуктов для самых различных отраслей, что дает производителям дополнительные возможности для роста. Во-вторых, благодаря решению проблем утилизации растущих объемов органических отходов происходит снижение экологических рисков. Наконец, технологии данной направленности являются ответом на такие глобальные вызовы, как угроза скрытого голода или энергетический кризис. Для России грамотная поддержка данного направления может, среди прочего, решить ряд внешних и внутренних экономических проблем, в т.ч. связанных с необходимостью снижения импортозависимости страны в сложившихся политических реалиях.

Развитие технологий переработки биомассы затрагивает множество сфер: пищевую, химическую, кормовую промышленность, биоэнергетику, катализ. Кроме того, среди отраслей-потребителей продуктов перерабатывающих производств, осуществляющих глубокую конверсию органического сырья, все более значимое место занимают медицина, фармакология и косметология. К сожалению, в России технологии глубокой переработки биомассы в настоящее время внедряются крайне медленно, однако в перспективе их развитие может способствовать генерации новых и эволюции существующих российских секторов эко-

номики. Мировой опыт показывает, что к наиболее интересным для России рынкам, развитие которых может быть интенсифицировано при грамотной поддержке и развитии приоритета, можно отнести: рынок глубокой переработки зерна, рынок биопластиков, рынок продуктов глубокой переработки отходов и субпродуктов животноводства и аквакультуры, рынок биотоплива, рынки продукции «зеленой химии», рынок кормов для животных и аквакультуры, рынок промышленных ферментных препаратов.

Стоит отметить, что промышленные биотехнологии, нацеленные на извлечение ценных продуктов из органического сырья, относятся к наукоемким технологиям, а значит их успешная реализация напрямую зависит от развития научно-технической сферы. Следовательно, одним из шагов на пути к внедрению новых подходов в России, должна стать грамотная поддержка соответствующих исследований и разработок на всех стадиях инновационного цикла.

UDC 604, 606

## PROCESSING OF AGRICULTURAL RAW MATERIALS AND WASTES IN RUSSIA. CHALLENGES, DRIVERS, PERSPECTIVES

Volchok A.A.

*Technological Platform «Bioindustry and Bioresources»*

*Moscow, RF*

*119071, Moscow, Leninsky prospect, 33/ 2. E-mail: nanka-net@mail.ru*

The transition to a new agriculture for our country today is the on-time development of many spheres making up the agro-industrial complex of Russia. One of them is the storage and processing of agricultural raw materials and products sphere.

**Key words:** biomass processing, waste recycling, biocatalysis, biotechnology, development of the scientific and technical sphere, growth points, innovation market

The direction of deep treatment of agricultural raw materials and wastes in the modern Russian agro-industrial complex include plant's processing, technologies of animal and fish products processing, recycling technologies for agricultural and food waste products.

Nowadays technologies and methods targeting effective processing of the biomass are widely spreading in developed countries. The reason of their popularity is big variety of important advantages that those technologies can propose. New developments in that field make it possible to obtain significant number of valuable products for various industries. It gives producers additional opportunities for growth. Furthermore, the organic wastes management reduces possible environmental risks. Those technologies are the answer to such global challenges as the threat of hidden hunger or the energy crisis. For Russia, the competent support of this kind of production can also address some external and internal economic problems such as the need to reduce the country's import dependence in the current political realities.

The development of biomass processing technologies affects many areas: food, chemical, feed industry, bioenergy, catalysis. Medicine, pharmacology and cosmetology are industries consuming products from organic raw materials. Nowadays advanced technologies of deep bioconversion are underutilized in Russia. In the future, their development can trigger the generation of new and evolution of existing sectors of the Russian economy. According the world experience most interesting directions for Russia may be: deep grain processing, bioplastics market, deep animal and fish by-products and wastes processing, biofuel and biogas production, markets of "green chemistry", fodder market, industrial enzyme preparations.

It should be noted that industrial biotechnologies focused on extraction of valuable products from organic raw materials are science-intensive technologies. Their successful implementation directly depends on the development of the scientific and technical base. Therefore, one of the important steps towards the introduction of new approaches in Russia should be the competent support of relevant researches and developments at all stages of the innovation stairs.

УДК: 664.951.014:577.15+639.272

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ С АДАПТОГЕННЫМИ СВОЙСТВАМИ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОЛИЗАТОВ МИДИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА ИСКУССТВЕННЫХ НОСИТЕЛЯХ В УСЛОВИЯХ АКВАКУЛЬТУРЫ

Гершунская В.В., Абрамова Л.С., Арнаутов М.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» (ФГБНУ «ВНИРО»), Москва, Россия  
107140, Москва, ул. Верхняя Красносельская, д. 17  
e-mail: protein@vniro.ru

Сформулированы предложения по разработке новых эффективных решений в области создания специализированной пищевой продукции, обладающей адаптогенными свойствами на основе ферментолитатов из мяса мидий, выращенных в условиях аквакультуры.

**Ключевые слова:** мидии аквакультуры, ферментолитаты, молекулярно-массовое распределение, адаптогенные свойства, специализированная пищевая продукция.

Мидии, являясь источником незаменимых аминокислот, таурина, допамина, микроэлементов, широко используются для получения продукции лечебного и профилактического назначения, биологически активных добавок к пище. В настоящее время промышленная технология гидролизатов основана на кислотном гидролизе бланшированного мяса мидий. Недостатком кислотных гидролизатов является высокое содержание неорганических солей, а также значительное снижение биологической ценности в результате разрушения некоторых незаменимых аминокислот (в первую очередь триптофана) в процессе гидролиза. До настоящего времени не реализована технология, позволяющая использовать целые мидии в створке, выращенные в условиях аквакультуры, для получения функциональных ингредиентов.

Известно, что в межстворчатой жидкости мидий содержится широкий спектр биологически активных соединений, в том числе иммуномодулятор митилан, который индуцирует синтез интерферона, подавляющего болезнетворную микрофлору. В России выращивание мидий в условиях аквакультуры освоено на Черном, Белом и дальневосточных морях. Мидии аквакультуры по ряду показателей превосходят мидии естественных популяций: они меньше загрязнены песком, имеют более высокую массу [1].

Вопрос комплексного использования сырья представляет значительный интерес и может быть решен биотехнологическими методами путем получения ферментолитатов, обладающих заранее заданным комплексом физико-химических свойств (хорошей растворимостью, молекулярно-массовым распределением), биологической ценностью, адаптогенным действием в составе профилактических и лечебных пищевых продуктов.

В качестве основы предложена ранее разработанная технология получения ферментативных гидролизатов мяса мидий [2]. Определены оптимальные условия протеолиза с использованием различных ферментных препаратов, хроматографически охарактеризовано молекулярно-массовое распределение пептидных фракций в составе ферментолитатов. Установлено, что одностадийный способ при использовании ферментных препаратов «Коллагеназа из гепатопанкреаса краба» или «Протозим» позволяет получить ферментолитаты мяса мидий с высоким выходом, состоящие более чем на 50% из пептидов с молекулярной массой менее 3,6 кДа, и обладающие высокими значениями радиозащитной и гемостимулирующей активности. Установлено, что в отличие от кислотного гидролизата, аминокислотный скор триптофана в ферментолитате мяса мидий составляет 174% относительно «идеального белка». Величина коэффициента эффективности белка для ферментолитата достоверно выше чем для мяса мидий.

Таким образом, рациональное использование, глубокая переработка сырья и получение *специализированной пищевой продукции с адаптогенными свойствами* представляют значительный интерес с практической и экономической точки зрения и будут способствовать дальнейшему развитию такого перспективного направления в аквакультуре как искусственное разведение мидий.

Статья подготовлена в рамках исследования с использованием средств субсидии Минобрнауки России (соглашение № 14.601.21.0016, уникальный идентификатор соглашения: RFMEFI60117X0016).



*Литература:*

Новикова М.В. Обоснование ресурсосберегающей технологии переработки беспозвоночных и отходов// Труды ВНИРО. - 2004. - Т. 143. - С. 76-82.

Арнаутов М.В., Абрамова Л.С., Гершунская В.В. Обоснование рациональных режимов ферментативного гидролиза мяса мидий// Труды ВНИРО. -2016. - Т. 159. - С. 61-68.

UDC: 664.951.014:577.15+639.272

## **PERSPECTIVES FOR TECHNOLOGY DEVELOPMENT OF SPECIALIZED FOOD PRODUCTS WITH ADAPTOGENIC PROPERTIES, BASED ON ENZYMIC HYDROLYZATES WHICH ARE PRODUCED FROM AQUACULTURE MUSSELS FARMED ON ARTIFICIAL SUBSTRATES**

**Gershunskaya V.V., Abramova L.S., Arnautov M.V.**

*Russian Federal Research Institute of Fisheries and Oceanography (FSBSI "VNIRO"), Moscow, Russia  
107140, Moscow, V. Krasnoselskaya str., 17  
e-mail: protein@vniro.ru*

Proposals are formulated on the development of new effective solutions in the design of specialized food products with adaptogenic properties based on fermentolysates of aquaculture mussels farmed on artificial substrates.

**Key words:** aquaculture mussels, enzymic hydrolyzates, molecular mass distribution, antistress properties, specialized food products

Mussels are widely used to produce products for therapeutic and preventive medicine purposes and bioactive additives as a source of essential amino acids, taurin, dopamine, and micronutrients. Currently applied industrial technologies of hydrolyzate production is based on acid hydrolysis of frozen-cooked mussels. A drawback of acid hydrolyzates is a large content of inorganic salts, as well as a significant decrease in the biological value due to degradation of some essential amino acids (principally tryptophan) during the acid hydrolysis. Despite numerous studies, we have not yet developed a technology to produce functional ingredients utilizing whole (in shells) mussels farmed on artificial substrates.

It is known that the mussel intervalvular solution contains a wide array of bioactive compounds, including mytilan, an immune response modifier capable of inducing synthesis of interferon which inhibits pathogenic flora. In Russia, mussel aquaculture is well developed in the Black, White, and Far East seas. Farmed mussels are superior to wild populations in some aspects, e.g. they are less soiled with sand; the specific weight of mussels in aquaculture is higher than in wildness [1].

The problem of a complex utilization of the raw material is of considerable interest and can be solved through application of biotechniques to produce enzymic hydrolyzates which have a preset complex of physical and chemical properties (such as good solubility, molar mass distribution) and biological availability and provide adaptogenic effect as ingredients to medical food.

In recent years experts of VNIRO have designed a technology of enzymic hydrolyzates from mussel meat applying various enzymic agents [2]. During a series of studies we have compared feasibility of various enzymatic agents in the mussel meat hydrolysis with specified physical and chemical properties and identified optimum conditions of the mussel meat proteolysis. We have performed a chromatographic analysis of the molar-mass distribution of peptide fractions in enzymic hydrolyzates and determined the main indicators which characterized their radioprotective and hemostimulating activities. It is found that a one-step enzymatic hydrolysis of the mussel meat using collagenase from the crab hepatopancreas or protozyme provides a high yield, more than 50% of which are peptides (molecular weight <3,6 kDa) with a high degree of radioprotective and hemostimulating activity.

It is found that by contrast with the acid hydrolyzate from the mussel meat, which amino-acid score lacks tryptophane, in the enzymic hydrolyzate, tryptophane makes 174% of the amino-acid score of the "ideal protein". Net uptake of the mussel enzymatic hydrolyzate (determined with balance method during experiments in vivo) made 98.0±0.9% showing its high biological value. The protein efficiency ratio in the enzymic hydrolyzate was significantly higher (>1.6 times) than in the mussel meat.

Thereby efficient utilization and advanced processing of the raw material are very important in both industrial and economic aspects and could promote further development of such a promising trend in

### Russian aquaculture as mussels farming.

The research was conducted under financial support of the Ministry of Education and Science of Russia (agreement No. 14.601.21.0016, agreement ID: RFMEFI60117X0016)

#### References:

1. Novikova M.V. Substantiation of resource-saving processing technologies of invertebrates and its by-products// *Trudy VNIRO*. – 2004. - V. 143. – P. 76-82
2. Arnautov M. V., Abramova L. S., Gershunskaya V. V. Study on rational modes of enzymatic hydrolysis of mussel meat// *Trudy VNIRO*. - 2016. - V. 159. – P. 61-68

## РАЗРАБОТКА И РЕГИСТРАЦИЯ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

### BIOPHARMACEUTICAL DRUG'S RESEARCH AND REGISTRATION

1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОПОДОБНЫХ АНАЛОГОВ ИНСУЛИНА НА МОДЕЛИ ЛИПОГЕНЕЗА, Никонова Ю.А., Тищенко К.В., Иванова О.И. ....	856
BIOSIMILAR INSULIN ANALOGUES COMPARATIVE EVALUATION ON THE LIPOGENESIS MODEL, Nikonova Yu.A., Tischenko K.V., Ivanova O.N. ....	857

УДК 57.085.2

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОПОДОБНЫХ АНАЛОГОВ ИНСУЛИНА НА МОДЕЛИ ЛИПОГЕНЕЗА

**Никонова Ю.А., Тищенко К.В., Иванова О.И.**

ЗАО «Фарм-Холдинг»

198515, г. Санкт-Петербург, Стрельна, ул. Связи, д.34-А, тел: +7 (812) 493-55-01, Julia.Nikonova@pharmholding.com

Разработан метод оценки биоаналогичности оригинальных и воспроизведённых инсулинов по стимулированию липогенеза в адипоцитах. Подобраны условия дифференцировки клеток-предшественниц, метод детекции липидных включений, временные точки и концентрации испытуемых препаратов. Метод применен для тестирования разработанного биоаналога инсулина с референтным лекарственным средством.

**Ключевые слова:** биоаналогичный препарат, референтный препарат, инсулин, липогенез

Исследования биоаналогичности лекарственных средств должны носить сравнительный характер и иметь необходимую чувствительность для выявления значимых различий между ответом биологической системы на оригинальный (референтный) и биоаналогичный (биоподобный, воспроизведённый) лекарственный препарат. Программа доклинического анализа аналогов инсулина, разработанная в ЗАО «Фарм-Холдинг», включает сравнительную оценку нескольких конечных метаболических эффектов на трех *in vitro* моделях инсулин-зависимых тканей-мишеней: дифференцированных миоцитах, жировой ткани и клетках печени.

Разработан чувствительный метод анализа индуцированного липогенеза. Метод основан на физиологических свойствах жировой ткани накапливать липиды под влиянием инсулина и заключается в дифференцировке клеток-предшественниц в адипоциты с последующей инкубацией с инсулинами в течение 10-14 дней. Каждый эксперимент включает прямое сравнение нескольких серий оригинального препарата и биоаналога. Накопление липидов после стимуляции оценивается методами световой микроскопии и количественной спектрофотометрии.

Стимуляция аналогами инсулина приводит к достоверному увеличению уровня липогенеза в дифференцированных адипоцитах. Разработанный метод позволяет анализировать дозо-зависимое и время-зависимое влияние инсулина на липогенез. Мы показали, что EC50 инсулина составляет 178 нМ на 7-й день, и наблюдали что насыщенный эффект на 12-й день инкубации. Мы сравнивали биоаналог и оригинальный препарат в нескольких временных точках и концентрациях. Стимуляция 300 и 600 нМ в течение 5 дней и 100 и 300 нМ в течение 7 дней были выбраны как наиболее чувствительные. Анализ данных показал сопоставимость фармакологической активности воспроизведенного и оригинального препаратов.

Разработанный метод удовлетворяет регуляторным требованиям для *in vitro* тестирования инсулиновых аналогов и также применим для разработки новых аналогов инсулина.

УДК 57.085.2

## **BIOSIMILAR INSULIN ANALOGUES COMPARATIVE EVALUATION ON THE LIPOGENESIS MODEL**

**Nikonova Yu.A., Tischenko K.V., Ivanova O.N.**

*CJSC «PharmHolding»*

*198515, Saint-Petersburg, Strelna, Svyazi str., 34-A, phone numb.: (812) 493 55 01, extension number 167 (office),  
extension number 155 (laboratory), e-mail: Julia.Nikonova@pharmholding.com*

Evaluation biosimilarity method of the reference and biosimilar insulin analogues was developed by the lipogenesis stimulation in the adipocytes tissue. Progenitor cells differentiation conditions, detection of lipids inclusions, time points and concentrations of researched pharmaceuticals were selected. The method is applied for the evaluation developed insulin analogue with the reference pharmaceutical.

**Key words:** biosimilar drug, reference drug, insulin, lipogenesis

Preclinical investigation of the similar biological pharmaceuticals should be comparative in nature and should be designed to have appropriate sensitivity to detect relevant differences of the biosimilar and the reference product. Preclinical program for insulin analogues analysis, developed by CJSC «PharmHolding», comprises comparative evaluation of several metabolic endpoints on 3 in vitro models of insulin-dependent target tissues: differentiate myocytes, adipose tissue and liver's cell culture.

A sensitive method of induced lipogenesis analysis was developed. Method is based on the physiological properties of adipose tissue to accumulate lipids under impact of insulin. The differentiation of the progenitor adipocytes was followed by incubation with insulins for the 10-14 days. Each experiment contained direct comparison of several lots of the original product and the biosimilar. The stimulated accumulation of the lipids was evaluated by light microscopy and quantitative spectrophotometry.

Stimulation with insulin analog lead to significant increase of lipogenesis rate in differentiated adipocytes. The developed method enabled both concentration-response and time-response analysis of insulin-stimulated lipogenesis. We showed EC50 178 nM of the effect at day 7, and observed saturation of fat accumulation at day 12 of incubation. To compared the biosimilar and original products at several time points and concentration. Stimulation with 300 and 600 nM during 5 days and 100 and 300 nM during 7 days were chosen as the most sensitive. Data analysis showed comparability of the pharmacological activity of the reproduced and original drugs.

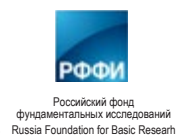
The developed method complies with regulatory requirements for in vitro methods of insulin analogs potency testing and is applicable for new insulin analogs discovery.



ОРГАНИЗАТОР / ORGANIZER



ПРИ УЧАСТИИ / SUPPORTED BY



+7 (495) 780-41-09 | e-mail: info@biomos.ru | www.biomos.ru